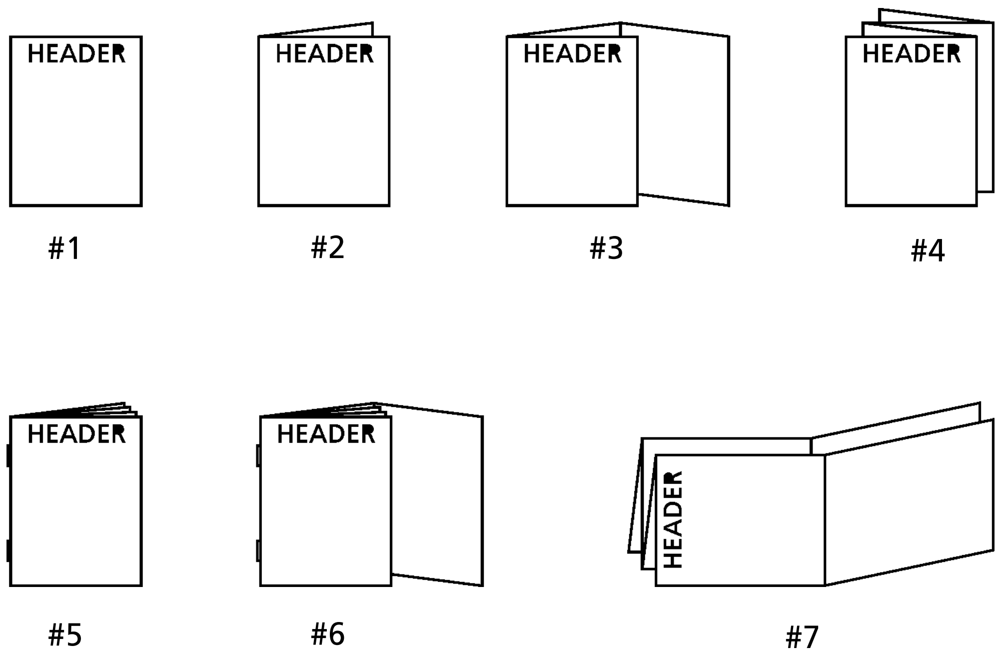
SO 0191-5

Revisions

Rev from	Rev to	ECO #
2009/11	**2010/10**	**5571-10**

Notes:

1. BD Cat. Number 245123, 245125, 245126, 245157
2. Blank (Sheet) Size: Length: 7 7/8″ Width: 8.5″
   Number of Pages: 80 Number of Sheets: 20
   Page Size: Length 7 7/8″ Width 4 1/4″ Final Folded Size: 7 7/8″ x 4 1/4″
3. Style (see illustrations below): # 5



4. See Specification Control Number N/A for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides [X] Yes [ ] No
   No. of Colors: 1 PMS# Black
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	BD Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA
Proofer	Date		
Checked By	Date		
Part Number: 8008200		Category and Description Package Insert, BACTEC MGIT 960 SIRE Kit	Sheet: 1 of 81 Scale: N/A A

BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kits
For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*

8008200
2010/10

Pokyny vám poskytne místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviseletétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Inštrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкзии. / Contactaţi reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucţiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжетесь с местным представителем компании BD. / Өзіңіздің жергілікті БД өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

INTENDED USE

The **BACTEC™ MGIT™** 960 SIRE Kit is a rapid qualitative procedure for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, from culture, to streptomycin (STR), isoniazid (INH), rifampin (RIF) and ethambutol (EMB). The **BACTEC™ MGIT™** 960 STR 4.0 Kit and the **BACTEC™ MGIT™** 960 INH 0.4 Kit are for testing at higher drug concentrations.

The **BACTEC™ MGIT™** 960 susceptibility test kits are used with the **BACTEC™ MGIT™** 960 and **BACTEC™ MGIT™** 320 Systems.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antimycobacterial susceptibility testing is valuable in the proper treatment of patients with tuberculosis. The treatment of tuberculosis is commonly through a multiple drug regimen that includes the antimycobacterial drugs streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol. It is important that the antimycobacterial drugs prescribed show appropriate activity against *Mycobacterium tuberculosis*, i.e., susceptibility of the isolate to the drug.

Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) has recently become a serious public health problem.[1] Resistance to any of the primary drugs, streptomycin (STR), isoniazid (INH), rifampin (RIF) and ethambutol (EMB), makes the disease more difficult and expensive to treat. The rapid detection of these resistant isolates is critical to effective patient management.

Two methods have been widely used for antimycobacterial susceptibility testing. The first method, known as the Method of Proportion,[2] uses Middlebrook and Cohn 7H10 Agar. It compares colony counts on drug-containing and drug-free media. Resistance to a drug is detected when 1% or more of the bacterial population is resistant to the drug concentration under test. Results are generally available after 21 days of incubation. The second method, known as the **BACTEC™** 460TB radiometric susceptibility method,[3] generally takes from 4 to 12 days. It is based on the production of radioactive ^{14}C-labeled carbon dioxide by the growing mycobacteria, manifested by a Growth Index increase in the system.

Historically, the Method of Proportion (MOP) procedure has included susceptibility testing of *M. tuberculosis* using two concentrations of antimicrobials. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) continues to recommend that the MOP test procedure include two concentrations of the primary drugs for testing except rifampin. The recommended low concentrations for the MOP procedure are the critical concentrations for these drugs. The critical concentration is defined as the drug concentration that allows the interpretation of a result as either resistant or susceptible. An isolate is determined resistant if 1% or more of the test population grows in the presence of the critical concentration of the drug. The high drug concentration is used to profile the degree of resistance within the population. This result provides information to the physician to assist in determining whether a modification to the therapy regimen is necessary.

The **BACTEC MGIT** 960 SIRE test provides the susceptibility result in approximately the same time frame as the **BACTEC** 460TB System. In addition, this method is non-radiometric and allows appropriate susceptibility results to be reported earlier, in most cases, than the MOP procedure.

The **BACTEC MGIT** 960 SIRE test was developed with critical concentrations for streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol that are slightly lower than the critical concentrations used in the MOP in order to avoid false susceptibility. This is most apparent for streptomycin where many isolates are close to the recommended critical concentration as performed by the MOP. For this reason, a second, higher drug concentration was developed for streptomycin and isoniazid. A susceptible result at the critical concentration can be reported and no other testing is necessary. Isolates that are resistant at the critical concentration of streptomycin, isoniazid and/or ethambutol, should be tested at a higher drug concentration either in the **BACTEC MGIT** system or using an alternate method. In this case, a final result of resistant at the critical concentration may be reported, with notification that an additional test at a higher concentration is being performed.

Testing of resistant isolates at a higher concentration is important to identify those that exhibit low-level resistance, i.e., resistant at the critical concentration and susceptible at the high concentration. The high concentrations in the **BACTEC MGIT** system were designed to be lower than the concentrations used in the MOP. This design of the **BACTEC MGIT** system is such that a resistant result, especially for streptomycin, may not always correlate to a resistant result at the high concentration in MOP. In the event that a streptomycin result is obtained that is resistant at the high concentration, an alternate method of testing at this concentration should be performed.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The **BBL™ MGIT™** 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tube is a tube containing a modified Middlebrook 7H9 Broth which supports the growth and detection of mycobacteria (see **BBL MGIT** 7 mL package insert). The **MGIT** tube contains a fluorescent compound embedded in silicone on the bottom of a 16 x 100 mm round-bottom tube. The fluorescent compound is sensitive to the presence of oxygen dissolved in the broth. The initial concentration of dissolved oxygen quenches the emission from the compound, and little fluorescence can be detected. Later, actively growing and respiring microorganisms consume the oxygen that allows the compound to fluoresce.

The **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit is a 4 – 13 day qualitative test. The test is based on growth of the *M. tuberculosis* isolate in a drug-containing tube compared to a drug-free tube (Growth Control). The **BACTEC MGIT** instrument monitors tubes for increased fluorescence. Analysis of fluorescence in the drug-containing tube compared to the fluorescence of the Growth Control tube is used by the instrument to determine susceptibility results.

The **BACTEC MGIT** instrument automatically interprets these results, and reports a susceptible or resistant result.

REAGENTS

BACTEC MGIT 960 SIRE Kit contains one each lyophilized vials of streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol and eight vials of SIRE Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Streptomycin .... 332 µg
Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Isoniazid .... 33.2 µg
Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Rifampin .... 332 µg
Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Ethambutol .... 1660 µg

BACTEC MGIT 960 IR Kit contains one each lyophilized vials of isoniazid and rifampin and four vials of SIRE Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Isoniazid .... 33.2 µg
Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Rifampin .... 332 µg

BACTEC MGIT 960 STR 4.0 Kit contains one vial lyophilized streptomycin and two vials of SIRE Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Streptomycin .... 664 µg

BACTEC MGIT 960 INH 0.4 Kit contains one vial lyophilized isoniazid and two vials of SIRE Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Isoniazid .... 66.4 µg

BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement contains 20 mL Middlebrook OADC enrichment

Approximate Formula* Per L Purified Water

Bovine albumin..................50.0 g   Catalase....................0.03 g
Dextrose ....20.0 g   Oleic Acid.................0.6 g

**Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.*

Storage and reconstitution of reagents: BACTEC MGIT 960 SIRE Drug vials – On receipt, store the lyophilized drug vials at 2 – 8°C. Once reconstituted, the antibiotic solutions may be frozen and stored at -20°C or colder up to six months, not to exceed the original expiration date. Once thawed, use immediately. Discard unused portions.

BACTEC MGIT SIRE Supplement – On receipt, store in dark at 2 – 8°C. Avoid freezing or overheating. Open and use prior to the expiration date. Minimize exposure to light.

Directions For Use:

Reconstitute each **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit Streptomycin lyophilized drug vial with **4 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 83 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit Isoniazid lyophilized drug vial with **4 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 8.3 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit Rifampin lyophilized drug vial with **4 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 83 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit Ethambutol lyophilized drug vial with **4 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 415 µg/mL.

NOTE: The following are reconstituted with a different volume. Failure to use the appropriate volume of sterile distilled water for reconstitution of the higher drug concentrations will invalidate those test results.

Reconstitute each **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 Kit Streptomycin lyophilized drug vial with **2 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 332 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 Kit Isoniazid lyophilized drug vial with **2 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 33.2 µg/mL.

Warnings and Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use.

POTENTIALLY INFECTIOUS TEST SPECIMEN: Pathogenic microorganisms, including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"[4-7] and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids.

Working with *M. tuberculosis* growth in culture requires Biosafety Level (BSL) 3 practices, containment equipment and facilities.

Read and follow directions contained in all appropriate package inserts including the **BBL MGIT** 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tube.

Prior to use, the user should examine the tubes and vials for evidence of contamination or damage. Discard any tubes or vials if they appear unsuitable. Dropped tubes should be examined carefully. If damage is seen, the tube should be discarded.

In the event of tube breakage: 1) Close the instrument drawers; 2) Turn off the instrument; 3) Vacate the area immediately; 4) Consult your facility/CDC guidelines. An inoculated leaking or broken tube may produce an aerosol of mycobacteria; appropriate handling should be observed.

Autoclave all inoculated **MGIT** tubes prior to disposal.

INOCULUM PREPARATION

All preparations detailed below must be from pure cultures of *M. tuberculosis*. The laboratory should confirm, by appropriate identification techniques, that the isolate to be tested is a pure culture of *M. tuberculosis*.

Inoculum can be prepared from solid media or from a positive **BACTEC MGIT** 7 mL tube. In addition, cultures grown in liquid and on solid media can be used to prepare a seed **MGIT** tube, which can then be used to prepare the inoculum. Each of these options is described below.

Preparation of the Inoculum from Solid Media:

NOTE: It is important to prepare the inoculum according to the following instructions to obtain the appropriate organism concentration for the susceptibility test.

1. Add 4 mL of **BBL™** Middlebrook 7H9 Broth (or **BBL MGIT** broth) to a 16.5 x 128 mm sterile tube with cap containing 8 – 10 glass beads.
2. Scrape with a sterile loop as many colonies as possible from growth no more than 14 days old, trying not to remove any solid medium. Suspend the colonies in the Middlebrook 7H9 Broth.
3. Vortex the suspension for 2 – 3 min to break up the larger clumps. The suspension should exceed a 1.0 McFarland standard in turbidity.
4. Let the suspension sit for 20 min without disturbing.
5. Transfer the supernatant fluid to another 16.5 x 128 mm sterile tube with cap (avoid transferring any of the sediment) and let sit for another 15 min.
6. Transfer the supernatant fluid (it should be smooth, free of any clumps) to a third 16.5 x 128 mm sterile tube. NOTE: The organism suspension should be greater than a 0.5 McFarland Standard at this step.

7. Adjust the suspension to a 0.5 McFarland standard by visual comparison to a 0.5 McFarland turbidity standard. Do not adjust below a 0.5 McFarland Standard.
8. Dilute 1 mL of the adjusted suspension in 4 mL of sterile saline (1:5 dilution). Proceed to "Inoculation Procedure for Susceptibility Test."

Preparation of the Inoculum from a Positive BACTEC MGIT 7 mL Tube:

NOTE: It is important to prepare the inoculum using the following time references to obtain the appropriate organism concentration for the susceptibility test.

1. The first day of an instrument positive **MGIT** tube is considered Day 0.
2. For the preparation of the test inoculum, a positive 7 mL **MGIT** tube should be used the day **after** it first becomes positive on the **BACTEC MGIT** instrument (Day 1), up to and including the fifth day (Day 5) after instrument positivity. A tube which has been positive longer than five days should be subcultured to a fresh 7 mL **MGIT** tube containing **BACTEC MGIT** Growth Supplement and tested on the **BACTEC MGIT** instrument until positive, and used from one to five days following positivity. See "Preparation of a Seed **MGIT** Tube from Liquid Media."
3. If the tube is a Day 1 or Day 2 positive, use the **MGIT** broth suspension for the inoculation procedures. Mix well. Proceed to "Inoculation Procedure for Susceptibility Test."
4. If the tube is a Day 3, Day 4, or Day 5 positive, mix well then dilute 1 mL of the positive broth in 4 mL of sterile saline (1:5 dilution). Mix tube thoroughly. Use the diluted suspension for the inoculation procedures. Proceed to "Inoculation Procedure for Susceptibility Test."

Preparation of a Seed MGIT Tube from Liquid Media

1. Mix the tube by inversion or vortexing.
2. Make a 1:100 dilution by adding 0.1 mL of the culture into 10 mL of **BBL** Middlebrook 7H9 Broth or **BBL MGIT** Broth. Mix well.
3. Add 0.5 mL of this suspension into a 7 mL **MGIT** tube supplemented with 0.8 mL of **BACTEC MGIT** Growth Supplement.
4. Cap tightly and gently mix by inverting 2-3 times.
5. Enter the tube into a **BACTEC MGIT** instrument and test until positive.

   NOTE: Time to positivity **must** be ≥ 4 days for use as AST inoculum. If tube becomes positive in < 4 days, return to step 1 and prepare a new seed tube.
6. This tube may now be used from one to five days following positivity. Proceed to "Preparation of the Inoculum from a Positive **BACTEC MGIT** 7 mL Tube" above.

Preparation of a Seed MGIT Tube from Solid Media

1. Using a sterile loop, scrape growth from a slant and add to a 7 mL **MGIT** tube supplemented with 0.8 mL of **BACTEC MGIT** Growth Supplement.
2. Cap tightly and gently mix by inverting 2 – 3 times.
3. Enter the tube into a **BACTEC MGIT** instrument and test until positive.

   NOTE: Time to positivity **must** be ≥ 4 days for use as AST inoculum. If tube becomes positive in < 4 days, return to step 1 and prepare a new seed tube.
4. This tube may now be used from one to five days following positivity. Proceed to "Preparation of the Inoculum from a Positive **BACTEC MGIT** 7 mL Tube" above.

PROCEDURE

Materials Provided: BACTEC MGIT 960 SIRE Kit containing one vial each lyophilized drug and eight vials of SIRE Supplement (approximately 40 tests per drug per kit). **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 Kit containing one vial each lyophilized drug and two vials of SIRE Supplement (approximately 20 tests per kit) and **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 Kit containing one vial each lyophilized drug and two vials of SIRE Supplement (approximately 20 tests per kit).

Materials Required But Not Provided: BBL MGIT 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tubes, ancillary culture media, reagents, quality control organisms and laboratory equipment as required for this procedure.

Inoculation Procedure for BACTEC MGIT 960 SIRE Kit Susceptibility Test:

1. Label five 7 mL **MGIT** tubes for each test isolate. Label one as GC (Growth Control), one as STR, one as INH, one as RIF and one as EMB. Place the tubes in the correct sequence in the appropriate size AST Set Carrier (see **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual).
2. Aseptically add 0.8 mL of **BACTEC MGIT** SIRE Supplement to each tube. NOTE: It is important to use the supplement supplied with the kit.

3. Aseptically pipet, using a micropipet, 100 µL of 83 µg/mL **MGIT** STR solution to the appropriately labeled **MGIT** tube. Aseptically pipet 100 µL of 8.3 µg/mL **MGIT** INH solution to the appropriately labeled **MGIT** tube. Aseptically pipet 100 µL of 83 µg/mL **MGIT** RIF solution to the appropriately labeled **MGIT** tube. Aseptically pipet 100 µL of 415 µg/mL **MGIT** EMB solution to the appropriately labeled **MGIT** tube. It is important to add the correct drug to the corresponding tube. No antibiotics should be added to the **MGIT** GC tube.

Drug	Concentration of Drug after Reconstitution*	Volume Added to MGIT Tubes for Test	Final Concentration in MGIT Tubes
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1.0 µg/mL
MGIT INH	8.3 µg/mL	100 µL	0.1 µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1.0 µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5.0 µg/mL

* These drugs must be reconstituted using **4 mL** sterile/deionized water to achieve concentrations indicated.

4. **Growth Control tube preparation and inoculation:** Aseptically pipet 0.1 mL of the organism suspension (see "**INOCULUM PREPARATION**") into 10 mL of sterile saline to prepare the 1:100 Growth Control suspension. Mix the Growth Control suspension thoroughly. Inoculate **0.5** mL of the 1:100 Growth Control suspension into the **MGIT** tube labeled "GC."
5. **Drug-containing tube inoculation:** Aseptically pipet 0.5 mL of the organism suspension (see "**INOCULUM PREPARATION**") into each of the FOUR remaining drug tubes (STR, INH, RIF, EMB).
6. Tightly recap the tubes. Mix tubes thoroughly by gentle inversion three to four times.
7. Enter the AST set into the **BACTEC MGIT** instrument using the AST set entry feature (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual). Ensure that the order of the tubes in the AST Set Carrier conforms to the set carrier definitions selected when performing the AST set entry feature.
8. Streak 0.1 mL of the organism suspension to a **Trypticase**™ Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) plate. Enclose in a plastic bag. Incubate at 35 – 37°C.
9. Check the blood agar plate at 48 h for bacterial contamination. If the blood agar plate shows no growth, then allow AST testing to proceed. If the blood agar plate shows growth, discard the AST set (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual) and repeat testing with pure culture.

Inoculation Procedure for BACTEC MGIT 960 STR 4.0 and INH 0.4 Kits Susceptibility Test:

It is recommended if resistance occurs at the critical concentration, a susceptibility profile test be performed which, at a minimum, tests the high concentration of the drug to which the isolate was originally resistant.

Isolate Source: The isolate used for this testing must have been prepared as described in "**INOCULUM PREPARATION**." A seed tube may be prepared from the drug-free Growth Control tube from the previously tested AST set of the isolate, by inoculating 0.5 mL to a fresh **MGIT** 7 mL tube containing **BACTEC MGIT** Growth Supplement. Once the seed tube is instrument positive, proceed as described in "**INOCULUM PREPARATION**: Preparation of the Inoculum from a Positive **MGIT** tube."

1. Label enough **MGIT** 7 mL tubes for the test isolate to have a **MGIT** GC (Growth Control) and a **MGIT** drug tube for each antimicrobic tested. Place the tubes in the correct sequence in the appropriate size AST Set Carrier (see **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual).
2. Aseptically add 0.8 mL of **BACTEC MGIT** SIRE Supplement to each tube. NOTE: It is important to use the supplement supplied with the kit.
3. Aseptically pipet, using a micropipet, 100 µL of the drug solution to the appropriately labeled **MGIT** tube. It is important to add the correct drug to the corresponding tube. No antibiotics should be added to the **MGIT** GC tube.

Drug	Concentration of Drug after Reconstitution*	Volume Added to MGIT Tubes for Test	Final Concentration in MGIT Tubes
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4.0 µg/mL
MGIT INH 0.4	33.2 µg/mL	100 µL	0.4 µg/mL

* These drugs must be reconstituted using **2 mL** sterile/deionized water to achieve concentrations indicated.

4. **Growth Control tube preparation and inoculation:** Aseptically pipet 0.1 mL of the organism suspension (see "**INOCULUM PREPARATION**") into 10 mL of sterile saline to prepare the 1:100 Growth Control suspension. Mix the Growth Control suspension

thoroughly. Inoculate **0.5** mL of the 1:100 Growth Control suspension into the **MGIT** tube labeled "GC."

5. **Drug-containing tube inoculation:** Aseptically pipet 0.5 mL of the organism suspension (see "**INOCULUM PREPARATION**") into each of the drug tubes.
6. Tightly recap the tubes. Mix tubes thoroughly by gentle inversion three to four times.
7. Enter the AST set into the **BACTEC MGIT** instrument using the AST set entry feature (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual). Ensure that the order of the tubes in the AST Set Carrier conforms to the set carrier definitions selected when performing the AST set entry feature.
8. Streak 0.1 mL of the organism suspension to a **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) plate. Enclose in a plastic bag. Incubate at 35 – 37°C.
9. Check the blood agar plate at 48 h for bacterial contamination. If the blood agar plate shows no growth, then allow AST testing to proceed. If the blood agar plate shows growth, discard the AST set (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual) and repeat testing with pure culture.

NOTE: The susceptibility test may be configured in a variety of formats. For example, a five tube carrier set containing only the critical concentrations can be configured into the system. A variety of other tube carrier sets can be configured depending on the optional profile tests being run (refer to **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual).

User Quality Control: Upon receipt of a new shipment or lot number of **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit vials, it is recommended that the control organism shown below be tested. The control organism should be a pure culture and the culture should be prepared according to the "**INOCULUM PREPARATION**" instructions.

The quality control (QC) AST Set should be prepared according to the "Inoculation Procedure for Susceptibility Test" instructions for the drug kits being tested. Important considerations when preparing the QC AST Set are the proper reconstitution of the lyophilized drugs and the proper dilution of the QC organism for the Growth Control and drug tubes.

It is important to add the appropriate drug to the corresponding labeled tube. The use of the pan-sensitive QC organism will not detect incorrect drug pipetted into AST Set tubes.

Observation of the proper results, as shown below, within 4 – 13 days indicates that the **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kits are ready for use in testing patient isolates. If the proper results are not observed, repeat the test. If, after repeating the test, the proper results are still not observed, do not use the product until you have contacted Technical Services at (800) 638-8663 (United States only).

Strain	**GC**	**MGIT STR**	**MGIT INH**	**MGIT RIF**	**MGIT EMB**
M. tuberculosis ATCC™ 27294	Positive	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible

Strain	**GC**	**MGIT STR 4.0**	**MGIT INH 0.4**
M. tuberculosis ATCC 27294	Positive	Susceptible	Susceptible

The same control organism should be run as batch QC once each week when susceptibility testing is performed. If the batch QC fails, do not report patient results for the drug(s) that failed for that testing period. Repeat the QC for the drug(s) and patient isolates affected by the initial QC failure. If the repeat QC does not perform as expected, do not report patient results. Do not use the product until you have contacted Technical Services at (800) 638-8663 (United States only).

During the external evaluation of the **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kits, the most common causes of QC failure were contaminated QC cultures, over/under inoculated AST Sets, drug not added to appropriate tubes and instrument error conditions.

RESULTS

The **BACTEC MGIT** instrument will monitor AST Sets until a susceptible or resistant determination is made. Once the set testing is completed, the results are reported by the **BACTEC MGIT** instrument (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual). The **BACTEC MGIT** instrument will report an AST Set result as an Error(X), no susceptibility interpretation, when certain conditions occur that may affect the test results. Conditions that may result in an Error(X) result are described in Section 7-Troubleshooting of the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual.

When reporting results, it is important to include the test method, drug name and concentration, whether the result is obtained with the **BACTEC MGIT** System or an alternate method. The Pulmonary and/or Infectious Disease specialist in TB control should be consulted concerning the appropriate therapeutic regimen and dosages.

In the event of unexpected resistant results, verify identification of isolate tested as *M. tuberculosis*. Ensure that only a pure culture was used (rule-out presence of mixed mycobacteria, etc.) Mono-resistance to ethambutol is uncommon and should be verified.[2,8]

BACTEC MGIT 960 SIRE critical concentration result reporting

Drug (concentration)	MGIT System result	Recommended Report	Action
STR (1.0 µg/mL) INH (0.1 µg/mL) RIF (1.0 µg/mL) EMB (5.0 µg/mL)	Susceptible (SIRE)	Isolate tested with **BACTEC MGIT** System [drug/concentration] and result is susceptible.	No action.
	Resistant (SIR)	Isolate tested with **BACTEC MGIT** System [drug/concentration] and result is resistant. Results of testing [drug] at a higher concentration to follow (if tested).	Recommend testing at higher concentration (STR and/or INH).
	Resistant (E)	<u>If resistant to more than ethambutol (EMB)</u> Isolate tested with **BACTEC MGIT** System [Ethambutol 5.0 µg/mL] and result is resistant. Consult laboratory for testing EMB at a higher concentration.	Recommend testing EMB at higher concentration using alternate method.
		<u>If mono-resistant to ethambutol (EMB)</u> Isolate tested with **BACTEC MGIT** System [Ethambutol 5.0 µg/mL] and result is resistant. Mono-resistance to ethambutol is uncommon. Consult laboratory for confirmation.	Recommend testing EMB at both critical concentration and higher concentration with an alternate method.
	Error (X)	No report.	Repeat test.

BACTEC MGIT 960 STR 4.0 and INH 0.4 result reporting

Drug (concentration)	MGIT System result	Recommended Report	Action
STR (4.0 µg/mL)	Susceptible	Isolate tested with **BACTEC MGIT** System streptomycin 4.0 µg/mL and result is susceptible. This isolate, with a resistant result at 1.0 µg/mL and a susceptible result at 4.0 µg/mL, indicates low-level resistance to streptomycin.	No action.
	Resistant	Isolate tested with **BACTEC MGIT** System streptomycin 4.0 µg/mL and result is resistant. Consult laboratory for confirmation.	Isolate should be tested by an alternate method to verify result.
	Error (X)	No report.	Repeat test.
INH (0.4 µg/mL)	Susceptible	Isolate tested with **BACTEC MGIT** System isoniazid 0.4 µg/mL and result is susceptible. This isolate, with a resistant result at 0.1 µg/mL and a susceptible result at 0.4 µg/mL, indicates low-level resistance to isoniazid.	No action.
	Resistant	Isolate tested with **BACTEC MGIT** System isoniazid 0.4 µg/mL and result is resistant.	No action.
	Error (X)	No report.	Repeat test.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The **BACTEC MGIT** System susceptibility test does not interpret the degree of susceptibility of the isolate being tested. Results are reported as either S, susceptible, or R, resistant, for the drug and concentration tested.

The **BACTEC MGIT** 960 SIRE test was developed with critical concentrations for streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol that are slightly lower than the critical concentrations used in the MOP in order to avoid false susceptibility. Testing of

the higher concentrations, as recommended, will enhance the ability to detect isolates with low-level resistance.

The **BACTEC MGIT** System susceptibility tests can only be performed using a **BACTEC MGIT** instrument. The AST Sets cannot be read manually.

Use only pure cultures of *M. tuberculosis*. Cultures that are contaminated or that may contain multiple species of mycobacteria may give erroneous results and should not be tested. Direct testing from clinical specimens is not recommended.

Suspensions made from solid media must be allowed to settle for the prescribed times prior to standardization. Inoculum preparations made from solid media should be visually compared to a 0.5 McFarland turbidity standard; failure to do so may give inaccurate results or cause an AST Set error.

Failure to use the 1:5 dilution of the organism suspension, when indicated, to inoculate the drug containing tubes may give inaccurate results.

Failure to use a 1:100 dilution of the organism suspension for the inoculation of the Growth Control tube may give inaccurate results or cause an AST Set error.

Failure to reconstitute the drugs with the appropriate volume of sterile distilled/deionized water may give inaccurate results.

Thorough mixing of inoculated tubes is important. Failure to mix the tubes adequately can lead to false resistant results.

Failure to load the tubes of the AST Set into the AST Set Carrier in the proper sequence may give inaccurate results. Failure to select the appropriate set carrier drug definition may result in invalid or inaccurate results.

Failure to load the AST Set into the instrument correctly will result in an anonymous condition that must be resolved within eight hours. If condition is not resolved within eight hours, the AST Set must be discarded and set up again.

Failure to use the SIRE Supplement in the AST Set may give inaccurate results. DO NOT add **BACTEC MGIT** Growth Supplement to the AST Set.

EXPECTED VALUES

A total of 106 clinical isolates of *M. tuberculosis* were tested with the **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test at four geographically diverse sites. The testing included both fresh clinical and stock isolates from both liquid and solid culture sources. A total of 200 susceptibility tests (liquid and solid) were performed at the critical concentrations of streptomycin (STR), isoniazid (INH) and rifampin (RIF) and a total of 223 susceptibility tests (liquid and solid) were performed at the critical concentration of ethambutol (EMB) during separate testing. The overall average time-to-result for the **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test is seven to eight days with a range from four to fourteen days. The data are shown in Figure 1 at end of insert.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

<u>Analytical Studies</u>

Liquid and Solid Media AST Inoculum Ranges:

Liquid media – The recommended procedure for preparing an AST Set from a positive **MGIT** 7 mL tube uses a direct inoculum on Day 1 and Day 2 post-positivity and a dilute (1:5) inoculum on Day 3 to Day 5 post-positivity. Internal studies show that inocula prepared from a Day 1 to Day 5 positive **MGIT** 7 mL tube range between 0.8 x 10^5 to 3.2 x 10^5 CFU/mL.

Solid media – The recommended procedure for preparing an AST Set from growth on solid media (up to 14 days) uses a 1:5 dilution of an organism suspension equivalent to a 0.5 McFarland Standard. Internal studies show that inocula prepared from solid medium culture range between 1.4 x 10^5 to 2.4 x 10^6 CFU/mL.

Lot Reproducibility:

Lot reproducibility was evaluated using twenty-five *M. tuberculosis* isolates (to include five ATCC™ strains). Each **BACTEC MGIT** 960 SIRE test at the critical drug concentration was performed in triplicate for a total of seventy-five results per drug. Each replicate represented a separate test condition differentiated by lot of SIRE drug and SIRE Supplement used (three lots each).

Those isolates that were determined resistant to streptomycin, isoniazid or ethambutol in the initial test were then tested with the high drug concentration, except the ATCC strains. In addition to the resistant isolates tested, two sensitive isolates to STR (critical concentration), two sensitive isolates to INH (critical concentration) and two sensitive isolates to EMB (critical concentration) were included in the susceptibility profile test. Observed results were compared to the expected results.

The overall reproducibility for each drug at the critical concentration is 96% for STR, 100% for INH, 100% for RIF and 100% for EMB. The overall reproducibility for each drug at the high concentration is 96% for STR 4.0 and 100% for INH 0.4.

CDC Challenge Panel Testing:

The performance of the **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test was evaluated using a panel of challenge isolates obtained from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), GA, USA. The panel consisted of thirty isolates of *M. tuberculosis* with known susceptibility patterns (using MOP). The panel was tested twice with the **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test and both results were in agreement. The **BACTEC MGIT** 960 SIRE results were compared to the CDC expected results.

The overall agreement with CDC expected results for each drug at the critical concentration is 93% for STR, 100% for INH, 100% for RIF and 100% for EMB. The overall agreement with CDC expected results for each drug at the high concentration is 100% for STR 4.0 and 100% for INH 0.4.

<u>Clinical Evaluation</u>

The **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test was evaluated at four geographically diverse clinical sites, composed of regional reference centers and university hospital-based laboratories, including one foreign site. The **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test was compared to the Method of Proportion (MOP)[2] susceptibility test method. The initial evaluation included the drugs streptomycin, isoniazid and rifampin. A separate evaluation was performed for the drug ethambutol.

Reproducibility Testing:

The reproducibility of the **BACTEC MGIT** 960 SIRE test was evaluated at the clinical sites using a panel of ten qualified isolates, including several isolates resistant to each of the drugs. The **BACTEC MGIT** 960 SIRE test results were compared to the expected results. The overall reproducibility for each drug at the critical concentration is 98.9% for STR, 99.7% for INH, 99.2% for RIF and 97.5% for EMB. Individual site reproducibility ranged from 89.9% to 100% for the combined critical concentration drug results. The overall reproducibility for each drug at the high concentration is 99.7% for STR 4.0 and 95.6% for INH 0.4. Individual site reproducibility ranged from 92.2% to 100% for the combined high concentration drug results.

CDC Challenge Panel Testing:

The performance of the **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test was evaluated using a panel of challenge isolates obtained from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), GA, USA. The panel consisted of thirty isolates of *M. tuberculosis* with known susceptibility patterns (using MOP) tested by each clinical site.

Table 1 shows the agreement of the **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test for each drug compared to the CDC expected results.

Table 1: CDC Challenge Panel – BACTEC MGIT 960 Clinical Site Testing

MGIT 960	Number tested	Number Correct	% Correct
STR 1.0	120	111	92.5
INH 0.1	120	119	99.2
RIF 1.0	120	120	100
EMB 5.0	119	111	93.3
STR 4.0	29*	29	100
INH 0.4	87*	82	94.3

* Only isolates resistant at critical concentrations tested at STR 4.0 and INH 0.4.

Clinical Isolate Testing:

A total of 106 clinical isolates of *M. tuberculosis* were tested with the **BACTEC MGIT** 960 SIRE susceptibility test and the MOP susceptibility test. This included testing of both fresh clinical and stock isolates from both liquid and solid culture sources. This generated a total of 195 test results for the initial susceptibility test performed for streptomycin, isoniazid and rifampin (critical concentration). A separate evaluation of ethambutol was performed from frozen aliquots of the original clinical and stock isolates as well as prospective clinical isolates from both liquid and solid culture sources. This generated a total of 223 test results for the ethambutol test at the critical concentration.

Table 2 presents the results from clinical isolate testing for each drug (critical concentration) from liquid source cultures. Table 3 presents the results from clinical isolate testing for each drug (critical concentration) from solid source cultures.

Table 2: Clinical Isolate Results – BACTEC MGIT 960 AST Compared to Method of Proportion from Liquid Source Cultures

	Method of Proportion			MGIT 960 AST System				
DRUG	Concen-tration	S	R	Concen-tration	Susceptible Results # Agreement	% Agreement (95% CI)	Resistant Result # Agreement	% Agreement (95% CI)
STR	2.0 µg/mL	69	27	1.0 µg/mL	62	90 (80–96)	26	96 (81–100)
INH	0.2 µg/mL	59	37	0.1 µg/mL	57	97 (88–100)	36	97 (86–100)
RIF	1.0 µg/mL	72	24	1.0 µg/mL	71	99 (93–100)	24	100 (95–100)
EMB	5.0 µg/mL	91	20	5.0 µg/mL	88	97 (91–99)	17	85 (62–97)

All isolates with discordant **MGIT** results were tested by MOP at two independent sites. Of the seven discordant STR resistant (R-960, S-MOP) isolates, three had resistant results from both sites and one had susceptible results from both sites. The remaining three had resistant results from one site and susceptible results from the other site. The discordant STR susceptible (S-960, R-MOP) isolate had susceptible results from both sites. The two discordant INH resistant (R-960, S-MOP) isolates had susceptible results from both sites. The discordant INH susceptible (S-960, R-MOP) isolate had susceptible results from both sites. The discordant RIF resistant (R-960, S-MOP) isolate had resistant results from both sites. The three discordant EMB resistant (R-960, S-MOP) isolates had susceptible results from both sites. Of the three discordant EMB susceptible (S-960, R-MOP) isolates, two had susceptible results from both sites and one had a resistant result from one site and a susceptible result from the other site.

Table 3: Clinical Isolate Results – BACTEC MGIT 960 AST Compared to Method of Proportion from Solid Source Cultures

	Method of Proportion			MGIT 960 AST System				
DRUG	Concen-tration	S	R	Concen-tration	Susceptible Results # Agreement	% Agreement (95% CI)	Resistant Result # Agreement	% Agreement (95% CI)
STR	2.0 µg/mL	70	29	1.0 µg/mL	65	93 (84–98)	28	97 (82–100)
INH	0.2 µg/mL	63	36	0.1 µg/mL	62	98 (92–100)	35	97 (86–100)
RIF	1.0 µg/mL	70	29	1.0 µg/mL	70	100 (95–100)	26	90 (73–98)
EMB	5.0 µg/mL	87	25	5.0 µg/mL	86	99 (94–100)	20	80 (59–93)

All isolates with discordant **MGIT** results were tested by MOP at two independent sites. Of the five discordant STR resistant (R-960, S-MOP) isolates, two had resistant results from both sites and one had susceptible results from both sites. The remaining two had resistant results from one site and susceptible results from the other site. The discordant STR susceptible (S-960, R-MOP) isolate had resistant results from both sites. The discordant INH resistant (R-960, S-MOP) isolate had susceptible results from both sites. The discordant INH susceptible (S-960, R-MOP) isolate had resistant results from both sites. The three discordant RIF susceptible (S-960, R-MOP) isolates had susceptible results from both sites. The one discordant EMB resistant (R-960, S-MOP) isolate had resistant results from both sites. Of the five discordant EMB susceptible (S-960, R-MOP) isolates, four had susceptible results from both sites. The remaining isolate had a resistant result from one site and a susceptible result from the other site.

Table 4 presents the results from clinical isolate testing for streptomycin and isoniazid (high concentration) from liquid source cultures. Table 5 presents the results from clinical isolate testing for streptomycin and isoniazid (high concentration) from solid source cultures.

Table 4: Clinical Isolate Results – BACTEC MGIT 960 AST Compared to Method of Proportion from Liquid Source Cultures

	Method of Proportion			MGIT 960 AST System				
DRUG	Concen-tration	S	R	Concen-tration	Susceptible Results # Agreement	% Agreement (95% CI)	Resistant Result # Agreement	% Agreement (95% CI)
STR	10.0 µg/mL	77	19	4.0 µg/mL	73*	95 (87–99)	17	90 (67–99)
INH	1.0 µg/mL	65	31	0.4 µg/mL	65*	100 (95–100)	29	94 (79–99)

* Assumes **MGIT** high drug S result for all isolates with **MGIT** low drug S result.

All isolates with discordant **MGIT** results were tested by MOP at two independent sites. The four discordant STR resistant (R-960, S-MOP) isolates had susceptible results from both sites. Of the two discordant STR susceptible (S-960, R-MOP) isolates, one had susceptible results from both sites and one had resistant results from both sites. Of the two discordant INH susceptible (S-960, R-MOP) isolates, one had susceptible results from both sites and one had resistant results from both sites.

Table 5: Clinical Isolate Results – BACTEC MGIT 960 AST Compared to Method of Proportion from Solid Source Cultures

	Method of Proportion			MGIT 960 AST System				
DRUG	Concen-tration	S	R	Concen-tration	Susceptible Results # Agreement	% Agreement (95% CI)	Resistant Result # Agreement	% Agreement (95% CI)
STR	10.0 µg/mL	78	21	4.0 µg/mL	73*	94 (86–98)	17	81 (58–95)
INH	1.0 µg/mL	68	31	0.4 µg/mL	68*	100 (95–100)	30	97 (83–100)

* Assumes **MGIT** high drug S result for all isolates with **MGIT** low drug S result.

All isolates with discordant **MGIT** results were tested by MOP at two independent sites. The five discordant STR resistant (R-960, S-MOP) isolates had susceptible results from both sites. Of the four discordant STR susceptible (S-960, R-MOP) isolates, three had susceptible results from both sites and one had resistant results from both sites. The discordant INH susceptible (S-960, R-MOP) isolate had resistant results from both sites.

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
245123	**BACTEC™ MGIT™** 960 SIRE Kit, carton of 4 lyophilized drug vials, and 8 SIRE Supplements.
245125	**BACTEC™ MGIT™** 960 STR 4.0 Kit, carton of 1 lyophilized drug vial and 2 SIRE Supplements.
245157	**BACTEC™ MGIT™** 960 IR Kit, carton of 2 lyophilized drug vials, and 4 SIRE Supplements.
245126	**BACTEC™ MGIT™** 960 INH 0.4 Kit, carton of 1 lyophilized drug vial and 2 SIRE Supplements.

REFERENCES

1. Barenfanger, J. 1993. Making your lab safe against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Microbiol. Newsl. *15*: 76-80.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003. Approved Standard M24-A. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. CLSI, Wayne, Pa.
3. BD Diagnostics. BACTEC™ 460TB System Product and Procedure Manual.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
5. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. *17*:53-80.
6. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC) 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
8. Ridderhof, J. 2001. Multicenter evaluation of 3.75 µg/mL ethambutol (EMB) in BACTEC vials for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Abstract C-244, American Society for Microbiology Abstracts 2001.

BD Trousse BACTEC MGIT 960 SIRE
Pour le test de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antimycobactériens

Français

APPLICATION

La trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE est un test de sensibilité qualitatif rapide de *Mycobacterium tuberculosis* en culture, à la streptomycine (STR), l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF) et l'éthambutol (EMB). La trousse **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 et la trousse **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 sont conçues pour tester des concentrations plus élevées d'antibiotique.

Les trousses de test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 sont destinées aux systèmes **BACTEC MGIT** 960 et **BACTEC MGIT** 320.

RESUME ET EXPLICATION

Le test de sensibilité aux antimycobactériens est précieux pour un traitement approprié des patients atteints de tuberculose. Le traitement de la tuberculose s'effectue en général par antibiothérapie multiple associant les antimycobactériens suivants : streptomycine, isoniazide, rifampicine et éthambutol. Il importe que les antimycobactériens prescrits démontrent une activité spécifique contre *Mycobacterium tuberculosis* vérifiée par la sensibilité de l'isolat à ces antibiotiques.

Les souches multirésistantes de *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) sont récemment devenues un grave problème de santé publique.[1] Une résistance à l'un des quatre antibiotiques principaux que sont la streptomycine (STR), l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF) et l'éthambutol (EMB) rend le traitement plus difficile et plus onéreux. La détection rapide de ces isolats résistants est essentielle pour une prise en charge efficace des patients.

Deux méthodes ont été largement utilisées pour tester la sensibilité aux antimycobactériens. La première méthode, connue sous le nom de méthode des proportions[2], utilise des géloses Middlebrook et Cohn 7H10. Elle compare le nombre de colonies sur gélose contenant l'antibiotique à celui obtenu sur milieu sans antibiotique. La résistance à un antibiotique est détectée lorsque 1 % ou plus d'une population bactérienne est résistante à la concentration d'antibiotique testé. Les résultats sont généralement disponibles après 21 jours d'incubation. La seconde méthode, connue sous le nom de méthode de sensibilité radiométrique **BACTEC** 460TB[3], prend généralement de 4 à 12 jours. Elle est basée sur la production de dioxyde de carbone radiomarqué au ^{14}C lors de la croissance des mycobactéries, telle qu'indiquée par une augmentation de l'index de croissance dans le système.

Historiquement, la méthode des proportions (MOP) a consisté en un test de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* utilisant deux concentrations d'antimicrobiens. Le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, anciennement NCCLS, Commission de normes de laboratoires d'analyses médicales aux Etats-Unis) continue à recommander l'emploi de deux concentrations pour tester la sensibilité aux principaux antibiotiques, exceptée la rifampicine, par la méthode des proportions (MOP). Les basses concentrations recommandées pour cette méthode correspondent aux concentrations critiques de ces antibiotiques. La concentration critique est définie comme la concentration de l'antibiotique qui permet l'interprétation du résultat comme résistant ou sensible. Un isolat est déterminé comme résistant si 1 % ou plus de la population testée se développe en présence de la concentration critique d'antibiotique. La concentration élevée d'antibiotique sert à établir le profil du degré de résistance au sein de la population. Ce résultat fournit des informations au médecin qui l'aident à déterminer si une modification du schéma thérapeutique est nécessaire.

Le test **BACTEC MGIT** 960 SIRE donne des résultats de sensibilité dans approximativement les mêmes délais que le système **BACTEC** 460TB. De plus, cette méthode n'utilise pas de radio-isotope et permet d'obtenir des résultats de test de sensibilité pertinents plus tôt, en général, qu'avec la méthode des proportions.

Le test **BACTEC MGIT** 960 SIRE a été mis au point avec des concentrations critiques de streptomycine, d'isoniazide, de rifampicine et d'éthambutol légèrement inférieures aux concentrations critiques utilisées dans la méthode des proportions afin d'éviter de faux résultats de sensibilité. Ceci est particulièrement notable pour la streptomycine où les résultats obtenus pour de nombreux isolats sont proches des concentrations critiques recommandées pour la méthode des proportions. Pour cette raison, une seconde concentration d'antibiotique, plus élevée, à été mise au point pour la streptomycine et l'isoniazide. Un résultat de sensibilité à la concentration critique peut être donné et aucun autre test n'est nécessaire. Les isolats résistants aux concentrations critiques de streptomycine, d'isoniazide et/ou d'éthambutol doivent être testés en utilisant une concentration plus élevée d'antibiotique, soit avec le système **BACTEC MGIT** soit par une méthode de substitution. Dans ce cas, un résultat définitif de résistance à la concentration

critique peut être donné en indiquant qu'un test complémentaire à une concentration plus élevée est en cours.

Le test de résistance des isolats à une concentration plus élevé est important pour identifier les isolats qui présentent un faible niveau de résistance, c'est-à-dire, une résistance à la concentration critique et une sensibilité à une concentration élevée. Les concentrations élevées employées dans le système **BACTEC MGIT** ont été conçues pour être inférieures aux concentrations utilisées dans la méthode des proportions. La conception du système **BACTEC MGIT** est telle qu'un résultat de résistance, notamment pour la streptomycine, n'est pas toujours corrélatif d'un résultat de résistance aux concentrations élevées utilisées dans la méthode des proportions. Si le résultat obtenu pour la streptomycine montre une résistance à la concentration élevée, le test doit être répété à cette concentration en utilisant une méthode de substitution.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le tube **BBL MGIT** 7 mL avec indicateur de croissance mycobactérienne est un tube contenant un bouillon Middlebrook 7H9 modifié qui permet la croissance et la détection des mycobactéries (cf. la notice d'emploi de **BBL MGIT** 7 mL). Le tube **MGIT** contient un composé fluorescent incorporé à la silicone présente au fond du tube de 16 x 100 mm à fond rond. Le composé fluorescent est sensible à la présence d'oxygène dissous dans le bouillon. La concentration d'oxygène dissous initiale éteint la fluorescence du composé et l'émission détectable est très faible. Par la suite, la croissance et la respiration des microorganismes consomment l'oxygène du milieu et permettent à la fluorescence de s'exprimer.

La trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE est un test qualitatif de 4 – 13 jours. Le test est basé sur une comparaison de la croissance d'un isolat de *M. tuberculosis* dans un tube contenant un antibiotique avec celle obtenue dans un tube sans antibiotique (témoin de croissance). L'instrument **BACTEC MGIT** contrôle les tubes pour déceler toute augmentation de fluorescence. L'instrument compare la fluorescence du tube contenant l'antibiotique à celle du tube témoin de croissance pour établir les résultats de sensibilité.

L'instrument **BACTEC MGIT** interprète automatiquement ces résultats et donne un résultat de sensibilité ou de résistance.

REACTIF

La trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE contient un flacon de streptomycine, d'isoniazide, de rifampicine et d'éthambutol lyophilisés, respectivement, et huit flacons de supplément SIRE.

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Streptomycine .. 332 µg

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Isoniazide .... 33,2 µg

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Rifampicine ...... 332 µg

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Éthambutol .... 1660 µg

La trousse **BACTEC MGIT** 960 IR contient un flacon d'isoniazide et un de rifampicine lyophilisés, et quatre flacons de supplément SIRE.

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Isoniazide .... 33,2 µg

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Rifampicine ..... 332 µg

La trousse **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 contient un flacon de streptomycine lyophilisée et deux flacons de supplément SIRE.

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Streptomycine .. 664 µg

La trousse **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 contient un flacon d'isoniazide lyophilisé et deux flacons de supplément SIRE.

Formule approximative* par flacon d'antibiotique lyophilisé : Isoniazide .... 66,4 µg

Le supplément **BACTEC MGIT** 960 SIRE contient 20 mL de supplément d'enrichissement Middlebrook OADC

Formule approximative par* litre d'eau distillée

Albumine bovine ....50,0 g   Catalase....................0,03 g
Dextrose ....20,0 g   Acide oléique...........0,6 g

**Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.*

Conservation et reconstitution des réactifs : Flacons d'antibiotique **BACTEC MGIT** 960 SIRE – Dès réception, conserver les flacons d'antibiotique lyophilisé à une température comprise entre 2 à 8 °C. Une fois reconstituées, les solutions d'antibiotique peuvent être congelées et conservées à -20 °C ou à une température inférieure jusqu'à 6 mois, sans dépasser la date de péremption d'origine. Une fois décongelées, les solutions doivent être utilisées immédiatement. Jeter les portions non utilisées.

Supplément **BACTEC MGIT** SIRE – Dès réception, conserver à l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler ni surchauffer. Ouvrir et utiliser avant la date de péremption. Maintenir à l'abri de la lumière.

Mode d'emploi :

Reconstituer chaque flacon de streptomycine lyophilisée de la trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE avec **4 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution mère à 83 µg/mL.

Reconstituer chaque flacon d'isoniazide lyophilisé de la trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE avec **4 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution mère à 8,3 µg/mL.

Reconstituer chaque flacon de rifampicine lyophilisée de la trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE avec **4 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution mère à 83 µg/mL.

Reconstituer chaque flacon d'éthambutol lyophilisé de la trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE avec **4 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution mère à 415 µg/mL.

REMARQUE : Les antibiotiques suivants sont reconstitués dans un volume différent. Le non-respect du volume d'eau distillée stérile requis pour la reconstitution des antibiotiques aux concentrations plus élevées invalide les résultats de test correspondants.

Reconstituer chaque flacon de streptomycine lyophilisée de la trousse **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 avec **2 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution mère à 332 µg/mL.

Reconstituer chaque flacon d'isoniazide lyophilisé de la trousse **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 avec **2 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution mère à 33,2 µg/mL.

Avertissements et precautions :

Réservé au diagnostic *in vitro.*

ÉCHANTILLON CLINIQUE POTENTIELLEMENT INFECTIEUX : Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »[4-7] et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

La manipulation de *M. tuberculosis* en culture nécessite des pratiques de sécurité biologique de niveau 3 (BSL) ainsi que les appareils et installations de confinement correspondants.

Lire et suivre les instructions contenues dans toutes les notices d'emploi concernées, y compris la notice des tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** 7 mL.

Avant utilisation, il convient d'examiner les tubes et les flacons pour vérifier l'absence de contamination ou de détérioration. Jeter tout tube ou flacon apparaissant suspect. Examiner avec soin les tubes tombés à terre. Éliminer les tubes visiblement endommagés.

En cas de bris de tube : 1) Fermer les tiroirs de l'instrument ; 2) Éteindre l'instrument ; 3) Évacuer les lieux immédiatement ; 4) Se reporter aux directives de l'établissement/du centre épidémiologique (CDC). Un tube ensemencé brisé ou présentant une fuite peut produire un aérosol de mycobactéries ; manipuler impérativement le tube comme il convient.

Stériliser à l'autoclave tous les tubes **MGIT** avant de les jeter.

PREPARATION DE L'INOCULUM

Toutes les préparations détaillées ci-dessous doivent être réalisées à partir de cultures pures de *M. tuberculosis.* Le laboratoire doit confirmer au moyen de techniques d'identification appropriées que l'isolat à tester est une culture pure de *M. tuberculosis.*

L'inoculum peut être préparé à partir de milieux solides ou d'un tube **BACTEC MGIT** 7 mL positif. De plus, des cultures sur milieux liquides ou solides peuvent être utilisées pour préparer un tube **MGIT** d'ensemencement qui peut ensuite servir à la préparation de l'inoculum. Chacune de ces options est décrite ci-après.

Préparation de l'inoculum à partir d'un milieu solide :

REMARQUE : Il importe de préparer l'inoculum conformément aux instructions suivantes pour obtenir la concentration de microorganismes appropriée pour le test de sensibilité.

1. Ajouter 4 mL de bouillon **BBL** Middlebrook 7H9 (ou bouillon **BBL MGIT** à un tube stérile de 16,5 x 128 mm avec capuchon, contenant 8 à 10 billes de verre.
2. À l'aide d'une anse bactériologique stérile, racler la surface d'une culture vieille de 14 jours au maximum afin de récolter le plus de colonies possible tout en veillant à

ne prélever aucun milieu solide. Suspendre les colonies dans le Bouillon Middlebrook 7H9.

3. Agiter la suspension au vortex pendant 2 à 3 min. afin de briser les gros agrégats. La turbidité de la suspension doit excéder le standard McFarland 1,0.
4. Laisser reposer complètement la suspension pendant 20 min.
5. Transférer le surnageant liquide dans un autre tube stérile de 16,5 x 128 mm avec capuchon (éviter de transférer le sédiment) et laisser reposer à nouveau pendant 15 min.
6. Transférer le surnageant liquide (qui doit être fluide et exempt de tout agrégat) dans un troisième tube stérile de 16,5 x 128 mm. REMARQUE : À ce stade, la turbidité de la suspension de microorganismes devrait être supérieure au standard McFarland 0,5.
7. Ajuster la suspension à une turbidité équivalente au standard McFarland 0,5 en la comparant visuellement à un standard de turbidité McFarland 0,5. La turbidité ne doit pas être inférieure au standard McFarland 0,5.
8. Diluer 1 mL de la suspension ajustée dans 4 mL de sérum physiologique stérile (dilution 1:5). Passer à la « Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité ».

Préparation de l'inoculum à partir d'un tube BACTEC MGIT 7 mL positif :

REMARQUE : Il importe de préparer l’inoculum en respectant les références temporelles suivantes pour obtenir la concentration de microorganismes appropriée pour le test de sensibilité.

1. Le premier jour d’un tube **MGIT** positif dans l’instrument est considéré comme Jour 0.
2. Pour la préparation de l’inoculum pour le test, un tube **MGIT** 7 mL positif doit être utilisé le jour **suivant** celui où il a été déterminé comme positif par l’instrument **BACTEC MGIT** (Jour 1) et au plus dans les cinq jours (Jour 5) suivant l’apparition de la positivité. Un tube positif depuis plus de cinq jours doit être repiqué dans un nouveau tube **MGIT** 7 mL contenant le supplément de croissance **BACTEC MGIT** et testé sur l’instrument **BACTEC MGIT** jusqu’à ce qu’il soit déterminé comme positif, puis utilisé dans les cinq jours qui suivent. Se reporter à « Préparation d'un tube **MGIT** d'ensemencement à partir de milieux liquides. »
3. S’il s’agit d’un tube positif au Jour 1 ou au Jour 2, utiliser la suspension de bouillon **MGIT** pour procéder à l’ensemencement. Bien mélanger. Passer à la « Méthode d’ensemencement pour le test de sensibilité ».
4. S’il s’agit d’un tube positif au Jour 3, Jour 4 ou Jour 5, bien mélanger puis diluer 1 mL de bouillon positif dans 4 mL de sérum physiologique stérile (dilution 1:5). Bien mélanger le contenu du tube. Utiliser la suspension diluée pour procéder à l’ensemencement. Passer à la « Méthode d’ensemencement pour le test de sensibilité ».

Préparation d'un tube MGIT d'ensemencement à partir de milieux liquides

1. Bien mélanger le contenu du tube en l'inversant ou le passant au vortex.
2. Faire une dilution à 1:100 en ajoutant 0,1 mL de culture dans 10 mL de bouillon **BBL** Middlebrook 7H9 Broth ou **BBL MGIT** Broth. Bien mélanger.
3. Ajouter 0,5 mL de cette suspension dans un tube 7 mL **MGIT** additionné de 0,8 mL de supplément de croissance **BACTEC MGIT**.
4. Boucher hermétiquement et mélanger en inversant 2 à 3 fois.
5. Placer le tube dans un instrument **BACTEC MGIT** et tester jusqu'à obtenir un résultat positif.

   REMARQUE : Le délai pour obtenir un résultat positif **doit** être ≥ 4 jours pour pouvoir servir comme inoculum AST. Si le tube devient positif en < 4 jours, revenir à l'étape 1 et préparer un nouveau tube d'ensemencement.
6. Ce tube peut désormais être utilisé d'un à cinq jours après être devenu positif. Passer à la « Préparation de l'inoculum à partir d'un tube **BACTEC MGIT** 7 mL positif » décrite ci-dessus.

Préparation d'un tube MGIT d'ensemencement à partir de milieux solides

1. A l'aide d'une anse d'ensemencement stérile, prélever un peu de culture d'une culture inclinée et l'ajouter à un tube 7 mL **MGIT** additionné de 0,8 mL de supplément de croissance **BACTEC MGIT**.
2. Boucher hermétiquement et mélanger en inversant 2 à 3 fois.
3. Placer le tube dans un instrument **BACTEC MGIT** et tester jusqu'à obtenir un résultat positif.

REMARQUE : Le délai pour obtenir un résultat positif **doit** être ≥ 4 jours pour pouvoir servir comme inoculum AST. Si le tube devient positif en < 4 jours, revenir à l'étape 1 et préparer un nouveau tube d'ensemencement.

4. Ce tube peut désormais être utilisé d'un à cinq jours après être devenu positif. Passer à la « Préparation de l'inoculum à partir d'un tube **BACTEC MGIT** 7 mL positif » décrite ci-dessus.

METHODE

Matériel fourni : Trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE contenant un flacon de chaque antibiotique lyophilisé et huit flacons de supplément SIRE (environ 40 tests par antibiotique et par trousse). Trousse **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 contenant un flacon d'antibiotique lyophilisé et deux flacons de supplément SIRE (environ 20 tests par trousse) et trousse **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 contenant un flacon d'antibiotique lyophilisé et deux flacons de supplément SIRE (environ 20 tests par trousse).

Matérieux requis mais non fournis : Tubes **BBL MGIT** 7 mL avec indicateur de croissance mycobactérienne, milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire nécessaires à la réalisation de cette méthode.

Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité avec la trousse BACTEC MGIT 960 SIRE :

1. Étiqueter cinq tubes **MGIT** 7 mL pour chaque isolat à tester. Étiqueter un tube TC (témoin de croissance), un tube STR, un tube INH, un tube RIF et un tube EMB. Placer les tubes dans l'ordre indiqué dans un support de module AST de taille appropriée (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**).
2. Ajouter stérilement 0,8 mL de supplément **BACTEC MGIT** SIRE à chaque tube. REMARQUE : Il importe d'utiliser le supplément fourni avec la trousse.
3. À l'aide d'une micropipette, pipeter stérilement 100 µL de la solution mère de **MGIT** STR à 83 µg/mL dans le tube **MGIT** convenablement étiqueté. Pipeter stérilement 100 µL de la solution mère de **MGIT** INH à 8,3 µg/mL dans le tube **MGIT** convenablement étiqueté. Pipeter stérilement 100 µL de la solution mère de **MGIT** RIF à 83 µg/mL dans le tube **MGIT** convenablement étiqueté. Pipeter stérilement 100 µL de la solution mère de **MGIT** EMB à 415 µg/mL dans le tube **MGIT** convenablement étiqueté. Il importe d'ajouter l'antibiotique qui convient dans le tube correspondant. N'ajouter aucun antibiotique dans le tube **MGIT** TC.

Antibiotique	Concentration d'antibiotique après reconstitution*	Volume ajouté aux tubes MGIT pour le test	Concentration finale dans les tubes MGIT
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1 µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0 µg/mL

* Ces antibiotiques doivent être reconstitués avec **4 mL** d'eau stérile/désionisée afin d'obtenir les concentrations indiquées.

4. **Préparation et ensemencement du tube de témoin de croissance :** Pipeter stérilement 0,1 mL de la suspension de microorganismes (voir « **PREPARATION DE L'INOCULUM** ») dans 10 mL de sérum physiologique stérile afin de préparer une suspension de témoin de croissance au 1:100. Mélanger soigneusement la suspension de témoin de croissance. Ensemencer **0.5** mL de la suspension de témoin de croissance au 1:100 dans le tube **MGIT** étiqueté « TC ».
5. **Ensemencement d'un tube contenant un antibiotique :** Pipeter stérilement 0,5 mL de la suspension de microorganismes (voir « **PREPARATION DE L'INOCULUM** ») dans chacun des QUATRE tubes d'antibiotique restants (STR, INH, RIF, EMB).
6. Bien reboucher les tubes. Mélanger soigneusement en renversant délicatement les tubes trois ou quatre fois.
7. Entrer le module AST dans l'instrument **BACTEC MGIT** en utilisant la fonction d'entrée de module AST (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**). S'assurer que l'ordre des tubes dans le support de module AST est conforme aux définitions de support de module sélectionnées lors de l'exécution de la fonction d'entrée de module AST.
8. Strier 0,1 mL de la suspension de microorganismes sur une gélose de **Trypticase** de soja additionnée de 5 % de sang de mouton (TSA II) en boîte de Pétri. Enfermer dans un sac plastique. Incuber à une température comprise entre 35 et 37 °C.
9. Rechercher la présence de contamination bactérienne sur la gélose au sang au bout de 48 h. Si la gélose au sang ne présente aucune trace de développement bactérien, laisser le test AST se poursuivre. Si la gélose au sang présente un développement

bactérien, jeter le module AST (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**) et répéter le test avec une culture pure.

Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité avec les trousses BACTEC MGIT 960 STR 4.0 et INH 0.4 :

Si une résistance apparaît à la concentration critique, il est recommandé d'effectuer un test de profil de sensibilité qui teste, au minimum, la concentration élevée de l'antibiotique à laquelle l'isolat était résistant à l'origine :

Source de l'isolat : L'isolat utilisé pour ce test doit avoir été préparé comme décrit à la section « **PREPARATION DE L'INOCULUM** ». Un tube d'ensemencement peut être préparé à partir du tube de témoin de croissance dépourvu d'antibiotique du module AST précédemment testé pour cet isolat, en ensemençant 0,5 mL dans un nouveau tube **MGIT** 7 mL contenant le supplément de croissance **BACTEC MGIT**. Une fois que le tube ensemencé est déterminé comme positif par l'instrument, procéder comme décrit à la section « **PREPARATION DE L'INOCULUM** : Préparation à partir d'un tube **MGIT** positif. »

1. Étiqueter un nombre suffisant de tubes **MGIT** 7 mL pour l'isolat à tester de façon à disposer d'un tube **MGIT** TC (témoin de croissance) et d'un tube **MGIT** pour chaque antibiotique testé. Placer les tubes dans l'ordre indiqué dans le support du module AST de taille appropriée (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**).
2. Ajouter stérilement 0,8 mL de supplément **BACTEC MGIT** SIRE à chaque tube. REMARQUE : Il importe d'utiliser le supplément fourni avec la trousse.
3. À l'aide d'une micropipette, pipeter stérilement 100 µL de la solution d'antibiotique dans le tube **MGIT** convenablement étiqueté. Il importe d'ajouter l'antibiotique qui convient dans le tube correspondant. N'ajouter aucun antibiotique dans le tube **MGIT** TC.

Antibiotique	Concentration d'antibiotique après reconstitution*	Volume ajouté aux tubes MGIT pour le test	Concentration finale dans les tubes MGIT
MGIT STR 4,0	332 µg/mL	100 µL	4,0 µg/mL
MGIT INH 0,4	33,2 µg/mL	100 µL	0,4 µg/mL

* Ces antibiotiques doivent être reconstitués avec **2 mL** d'eau stérile/désionisée afin d'obtenir les concentrations indiquées.

4. **Préparation et ensemencement du tube de témoin de croissance :** Pipeter stérilement 0,1 mL de la suspension de microorganismes (voir « **PREPARATION DE L'INOCULUM** ») dans 10 mL de sérum physiologique stérile afin de préparer une suspension de témoin de croissance au 1:100. Mélanger soigneusement la solution de témoin de croissance. Ensemencer **0,5** mL de la suspension de témoin de croissance au 1:100 dans le tube **MGIT** étiqueté « TC ».
5. **Ensemencement d'un tube contenant un antibiotique :** Pipeter stérilement 0,5 mL de la suspension de microorganismes (voir « **PREPARATION DE L'INOCULUM** ») dans chacun des tubes d'antibiotique.
6. Bien reboucher les tubes. Mélanger soigneusement en renversant délicatement les tubes trois ou quatre fois.
7. Entrer le module AST dans l'instrument **BACTEC MGIT** au moyen de la fonction d'entrée de module AST (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**). S'assurer que l'ordre des tubes dans le support de module AST est conforme aux définitions de support de module sélectionnées lors de l'exécution de la fonction d'entrée de module AST.
8. Strier 0,1 mL de la suspension de microorganismes sur une gélose de **Trypticase** de soja additionnée de 5 % de sang de mouton (TSA II) en boîte de Pétri. Enfermer dans un sac plastique. Incuber à une température comprise entre 35 et 37 °C.
9. Rechercher la présence de contamination bactérienne sur la gélose au sang au bout de 48 h. Si la gélose au sang ne présente aucune trace de développement bactérien, laisser le test AST se poursuivre. Si la gélose au sang présente un développement bactérien, jeter le module AST (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**) et répéter le test avec une culture pure.

REMARQUE : Le test de sensibilité peut être configuré suivant différents formats. Par exemple, un module support à 5 tubes contenant uniquement les concentrations critiques peut être configuré dans le système. Différents modules supports de tube peuvent être configurés en fonction des tests facultatifs de profil exécutés (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**).

Contrôle de qualité par l'utilisateur : Dès réception d'un nouvel arrivage ou d'un nouveau numéro de lot de flacons de trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE, il est recommandé de tester la souche de contrôle indiquée ci-dessous. La souche de contrôle doit être une culture pure, préparée conformément aux instructions de « **PREPARATION DE L'INOCULUM** ».

Le module AST de contrôle de qualité (CQ) doit être préparé conformément aux instructions de la « Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité » des trousses d'antibiotique testées. Les considérations importantes pour la préparation du module AST CQ sont la bonne reconstitution des antibiotiques lyophilisés et la dilution adéquate de la souche de contrôle de qualité pour les tubes de témoin de croissance et d'antibiotiques.

Il importe d'ajouter l'antibiotique qui convient dans le tube correspondant. L'utilisation d'une souche de contrôle de qualité à spectre de sensibilité large ne révélera pas un antibiotique incorrect pipeté dans les tubes du module AST.

L'obtention des résultats escomptés, indiqués ci-dessous, dans les 4 à 13 jours signifie que les trousses **BACTEC MGIT** 960 SIRE sont prêtes à être utilisées pour tester des isolats provenant de patients. Répéter le test si les résultats appropriés ne sont pas obtenus. Si, après répétition du test, les résultats escomptés ne sont toujours pas obtenus, ne pas utiliser le produit avant d'avoir contacté le représentant local de Becton Dickinson.

Souches	**TC**	**MGIT STR**	**MGIT INH**	**MGIT RIF**	**MGIT EMB**
M. tuberculosis ATCC 27294	Positif	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Souches	**TC**	**MGIT STR 4,0**	**MGIT INH 0,4**
M. tuberculosis ATCC 27294	Positif	Sensible	Sensible

La même souche de contrôle doit être testée comme contrôle de qualité de lot une fois par semaine lorsque le test de sensibilité est effectué. Si le contrôle de qualité du lot échoue, ne pas donner les résultats cliniques pour le(s) antibiotique(s) dont le test a échoué pour la période considérée. Répéter le contrôle de qualité pour le(s) antibiotique(s) et les isolats cliniques concernés par l'échec du contrôle de qualité initial. Si le nouveau contrôle de qualité ne donne pas les résultats attendus, ne pas communiquer les résultats de patients. Ne pas utiliser le produit avant d'avoir contacté le représentant local de Becton Dickinson.

Lors de l'évaluation externe des trousses **BACTEC MGIT** 960 SIRE, les causes les plus fréquences d'échec du contrôle de qualité sont des cultures de CQ contaminées, des modules AST sur/sous-ensemencés, des antibiotiques non ajoutés aux tubes correspondants et des conditions d'erreur de l'instrument.

RESULTATS

L'instrument **BACTEC MGIT** contrôle les modules AST jusqu'à ce que la détermination de sensibilité ou de résistance soit effectuée. Une fois que le test est terminé, les résultats sont donnés par l'instrument **BACTEC MGIT** (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**). L'instrument **BACTEC MGIT** donne un résultat d'erreur(X) ou d'absence d'interprétation de sensibilité pour le module AST lorsque certaines conditions susceptibles d'affecter les résultats de test sont rencontrées. Les conditions susceptibles de se traduire par un résultat d'erreur(X) sont décrites dans la Section 7 – Résolution des problèmes du manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**.

Lors de la communication des résultats, il est important d'inclure la méthode de test, le nom de l'antibiotique et sa concentration, et d'indiquer si le résultat a été obtenu avec l'instrument **BACTEC MGIT** ou avec une méthode de substitution. Le spécialiste des maladies pulmonaires et/ou infectieuses dans la prise en charge de la tuberculose doit être consulté concernant le régime thérapeutique et les dosages appropriés.

En cas de résultats de résistance inattendus, vérifier l'identité de l'isolat testé comme *M. tuberculosis*. S'assurer que seule une culture pure a été utilisée (écarter la présence d'un mélange de mycobactéries, etc.). Une mono-résistance à l'éthambutol n'est pas courante et doit être confirmée.[2,8]

Résultats donnés aux concentrations critiques avec BACTEC MGIT 960 SIRE

Antibiotique (concentration)	Résultat du système MGIT	Résultat donné	Action
STR (1,0 µg/mL) INH (0,1 µg/mL) RIF (1,0 µg/mL) EMB (5,0 µg/mL)	Sensible (SIRE)	Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [antibiotique/concentration] ; résultat : sensible.	Aucune action.
	Résistant (SIR)	Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [antibiotique/concentration] ; résultat : résistant. Résultat de tests [antibiotique] à une concentration plus élevée à suivre (si testé).	Test recommandé à une concentration plus élevée (STR et/ou INH).
	Résistant (E)	<u>Si résistant à d'autres antibiotiques que l'éthambutol (EMB)</u> Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [Éthambutol 5,0 µg/mL] ; résultat : résistant. Consulter le laboratoire pour tester EMB à une concentration plus élevée.	Test de l'EMB recommandé à une concentration plus élevée en utilisant une méthode de substitution.
		<u>Si résistant uniquement à l'éthambutol (EMB)</u> Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [Éthambutol 5,0 µg/mL] ; résultat : résistant. Une mono-résistance à l'éthambutol n'est pas courante. Demander confirmation au laboratoire.	Test de l'EMB recommandé àla concentration critique et à une concentration plus élevée en utilisant une méthode de substitution.
	Erreur (X)	Aucun résultat donné.	Renouveler le test.

Résultats donnés avec BACTEC MGIT 960 STR 4.0 et INH 0.4

Antibiotique (concentration)	Résultat du système MGIT	Résultat donné	Action
STR (4,0 µg/mL)	Sensible	Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [streptomycine 4,0 µg/mL] ; résultat : sensible. Cet isolat,avec un résultat de résistance à 1,0 µg/mL et un résultat de sensibilité à 4,0 µg/mL, présente un faible niveau de résistance à la streptomycine.	Aucune action.
	Résistant	Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [streptomycine 4,0 µg/mL] ; résultat : résistant. Demander confirmation au laboratoire.	L'isolat doit être testé par une méthode de substitution pour confirmer le résultat.
	Erreur (X)	Aucun résultat donné.	Renouveler le test.
INH (0,4 µg/mL)	Sensible	Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [isoniazide 0,4 µg/mL] ; résultat : sensible. Cet isolat, avec un résultat de résistance à 0,1 µg/mL et un résultat de sensibilité à 0,4 µg/mL, présente un faible niveau de résistance à la l'isoniazide.	Aucune action.
	Résistant	Isolat testé avec le système **BACTEC MGIT** [isoniazide 0,4 µg/mL] ; résultat : résistant.	Aucune action.
	Erreur (X)	Aucun résultat donné.	Renouveler le test.

LIMITES DE LA METHODE

Le test de sensibilité du système **BACTEC MGIT** n'interprète pas le degré de sensibilité de l'isolat testé. Les résultats sont donnés comme S, sensible, ou R, résistant, pour l'antibiotique et la concentration testés.

Le test **BACTEC MGIT** 960 SIRE a été mis au point avec des concentrations critiques de streptomycine, d'isoniazide, de rifampicine et d'éthambutol légèrement inférieures aux concentrations critiques utilisées dans la méthode des proportions afin d'éviter de faux résultats de sensibilité. Le test à des concentrations plus élevées, comme recommandé, augmente la probabilité de détecter des isolats qui présentent un faible niveau de résistance.

Les tests de sensibilité du système **BACTEC MGIT** ne peuvent être effectués qu'au moyen d'un instrument **BACTEC MGIT**. Les modules AST ne peuvent pas être lus manuellement.

Utiliser uniquement des cultures pures de *M. tuberculosis.* Les cultures contaminées ou qui contiennent des souches multiples de mycobactéries peuvent donner des résultats erronés et ne doivent pas être testées. Le test direct à partir d'échantillons cliniques n'est pas recommandé.

Il faut laisser reposer les suspensions réalisées à partir de milieux solides pendant les temps prescrits avant la normalisation. Les préparations d'inoculum réalisées à partir de milieux solides doivent être comparées visuellement au standard de turbidité McFarland 0,5 pour ne pas risquer de produire des résultats inexacts ou d'entraîner une erreur de module AST.

Le fait de ne pas utiliser la dilution au 1:5 de la suspension de microorganismes, comme indiqué, pour ensemencer les tubes contenant des antibiotiques peut entraîner des résultats erronés.

Le fait de ne pas utiliser la dilution au 1:100 de la suspension de microorganismes pour ensemencer le tube de témoin de croissance peut entraîner des résultats erronés ou causer une erreur du module AST.

Le fait de ne pas reconstituer les antibiotiques avec les volumes d'eau stérile distillée ou désionisée adéquats peut engendrer des résultats erronés.

Il importe de mélanger complètement le contenu des tubes ensemencés. Un mélange imparfait peut conduire à un faux résultat de résistance.

Le fait de ne pas charger les tubes du module AST dans le support de module AST dans l'ordre indiqué peut entraîner des résultats erronés. Le fait de ne pas sélectionner la définition de support de modules appropriée peut entraîner des résultats invalides ou inexacts.

Un chargement incorrect du module AST dans l'instrument se traduit par une condition d'erreur anonyme qui doit être résolue dans les huit heures. Si la condition d'erreur n'est pas résolue dans les huit heures, le module AST Set doit être éliminé et configuré de nouveau.

Le fait de ne pas utiliser le supplément SIRE dans le module AST peut conduire à des résultats erronés. NE PAS ajouter de supplément de croissance **BACTEC MGIT** dans le module AST.

VALEURS ATTENDUES

Au total, 106 isolats cliniques de *M. tuberculosis* ont été testés avec le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE dans quatre centres investigateurs éloignés géographiquement. Les tests incluaient des échantillons cliniques frais et des isolats mères provenant de cultures en milieux liquide et solide. Au total, 200 tests de sensibilité (liquides et solides) ont été effectués aux concentrations critiques de streptomycine (STR), d'isoniazide (INH) et de rifampicine (RIF), et 223 tests de sensibilité (liquides et solides) au total ont été effectués à la concentration critique d'éthambutol (EMB) au cours d'un test distinct. Le délai moyen global d'obtention d'un résultat pour le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE est de sept à huit jours sur un intervalle de 4 à 14 jours. Les données sont représentées à la figure 1 (voir la fin de la notice).

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

<u>Études analytiques</u>

Gammes d'inoculum AST pour milieux liquides et solides :

Milieux liquides – La procédure recommandée de préparation d'un module AST à partir d'un tube **MGIT** 7 mL utilise un ensemencement direct le Jour 1 et le Jour 2 suivant la détermination de la positivité est un ensemencement dilué (1:5) les Jours 3 à 5 suivant la détermination de la positivité. Des études internes montrent que les inoculum préparés à partir d'un tube **MGIT** 7 mL positif du Jour 1 au Jour 5 comptent 0,8 x 10^5 à 3,2 x 10^5 CFU/mL.

Milieux solides – La procédure recommandée de préparation d'un module AST à partir d'une croissance bactérienne sur milieu solide (jusqu'à 14 jours) utilise une dilution au 1:5 de la suspension de microorganismes équivalente à un standard de McFarland 0,5. Des études internes montrent que les inoculum préparés à partir d'une culture sur milieu solide comptent 1,4 x 10^5 à 2,4 x 10^6 CFU/mL.

Reproductibilité de lot :

La reproductibilité de lot a été évaluée en utilisant vingt-cinq isolats de *M. tuberculosis* (pour inclure cinq souches ATCC). Chaque test **BACTEC MGIT** 960 SIRE à la concentration d'antibiotique critique a été effectué en triple exemplaire pour un total de 75 résultats par antibiotique. Chaque répétition de test représentait une condition de test distincte, différenciée par les lots d'antibiotique SIRE et de supplément SIRE utilisés (trois lots chacun).

Les isolats déterminés comme résistants à la streptomycine, l'isoniazide ou l'éthambutol lors du test initial ont été testés à la concentration plus élevée d'antibiotique, à l'exception des souches ATCC. En plus des isolats résistants testés, deux isolats sensibles à la STR (concentration critique), deux isolats sensibles à l'INH (concentration critique) et deux isolats sensibles à l'EMB (concentration critique) ont été inclus dans le test du profil de sensibilité. Les résultats obtenus étaient comparés aux résultats attendus.

La reproductibilité globale pour chacun des antibiotiques à la concentration critique est de 96 % pour STR, 100 % pour INH, 100 % pour RIF et 100 % pour EMB. La reproductibilité globale pour chacun des antibiotiques à la concentration élevée est de 96 % pour STR 4.0 et 100 % pour INH 0.4.

Test du panel d'épreuve du CDC :

Les performances du test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE ont été évaluées en utilisant un panel d'isolats d'épreuve obtenu auprès du *Centers for Disease Control and Prevention* (centre épidémiologique) aux États-Unis. Le panel se compose de 30 isolats de *M. tuberculosis* aux profils de sensibilité connus (en utilisant la méthode des proportions). Le panel a été testé à deux reprises avec le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE et les deux résultats étaient concordants. Les résultats obtenus avec **BACTEC MGIT** 960 SIRE ont été comparés aux résultats attendus du CDC.

Le pourcentage de concordance global avec les résultats attendus du CDC pour chacun des antibiotiques à la concentration critique est de 93 % pour STR, 100 % pour INH, 100 % pour RIF et 100 % pour EMB. Le pourcentage de concordance global avec les résultats attendus du CDC pour chacun des antibiotiques à la concentration élevée est de 100 % pour STR 4.0 et de 100 % pour INH 0.4.

Évaluation clinique

Le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE a été évalué dans quatre centres investigateurs éloignés géographiquement, comprenant des centres de référencement régionaux et des laboratoires de CHU, parmi lesquels un centre situé à l'étranger. Le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE a été comparé au test de sensibilité par la méthode des proportions (MOP)[2]. L'évaluation initiale incluait les antibiotiques streptomycine, isoniazide et rifampicine. Une évaluation distincte a été effectuée pour l'antibiotique éthambutol.

Test de reproductibilité :

La reproductibilité du test **BACTEC MGIT** 960 SIRE a été évaluée dans les centres investigateurs en utilisant un panel de dix isolats qualifiés, parmi lesquels plusieurs isolats résistants à chacun des antibiotiques. Les résultats obtenus avec **BACTEC MGIT** 960 SIRE ont été comparés aux résultats attendus. La reproductibilité globale pour chacun des antibiotiques à la concentration critique est de 98,9 % pour STR, 99,7 % pour INH, 99,2 % pour RIF et 97,5 % pour EMB. La reproductibilité pour chacun des sites varie de 89,9 % à 100 % pour les résultats combinés des antibiotiques aux concentrations critiques. La reproductibilité globale pour chacun des antibiotiques à la concentration élevée est de 99,7 % pour STR 4.0 et de 95,6 % pour INH 0.4. La reproductibilité pour chacun des sites varie de 92,2 % à 100 % pour les résultats combinés des antibiotiques aux concentrations élevées.

Test du panel d'épreuve du CDC :

Les performances du test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE ont été évaluées en utilisant un panel d'isolats d'épreuve obtenu auprès du *Centers for Disease Control and Prevention* (centre épidémiologique) aux États-Unis. Le panel se compose de 30 isolats de *M. tuberculosis* aux profils de sensibilité connus (en utilisant la méthode des proportions) testé par chaque centre investigateur.

Le tableau 1 indique le pourcentage de concordance du test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE pour chaque antibiotique comparativement aux résultats attendus du CDC.

Tableau 1 : Panel d'épreuve du CDC – Test en centre investigateur du BACTEC MGIT 960

MGIT 960	Nombre d'isolats testés	Nombre d'isolats corrects	% d'isolats corrects
STR 1.0	120	111	92,5
INH 0.1	120	119	99,2
RIF 1.0	120	120	100
EMB 5.0	119	111	93,3
STR 4.0	29*	29	100
INH 0.4	87*	82	94,3

* Seuls les isolats résistants aux concentrations critiques ont été testés avec STR 4.0 et INH 0.4.

Test d'isolats cliniques :

Au total, 106 isolats cliniques de *M. tuberculosis* ont été testés avec le test de sensibilité **BACTEC MGIT** 960 SIRE et le test de sensibilité par la méthode des proportions. Les tests incluaient des échantillons cliniques frais et des isolats mères provenant de cultures en milieux liquides et solides. Au total, 195 résultats de test ont été obtenus pour le test initial de sensibilité effectué pour la streptomycine, l'isoniazide et la rifampicine (concentration critique). Une évaluation distincte de l'éthambutol a été effectuée à partir d'aliquots congelés des isolats cliniques d'origine et des isolats mères, ainsi que des isolats cliniques rétrospectifs issus de cultures en milieux liquides et solides. Au total, 223 résultats de test ont été obtenus pour le test de sensibilité de l'éthambutol à la concentration critique.

Le tableau 2 présente les résultats obtenus pour chaque antibiotique pour le test des isolats cliniques (concentration critique) issus de cultures en milieu liquide. Le tableau 3 présente les résultats obtenus pour chaque antibiotique pour le test des isolats cliniques (concentration critique) issus de cultures sur milieux solides.

Tableau 2 : Résultat des isolats cliniques – BACTEC MGIT 960 AST comparé à la méthode des proportions à partir de cultures en milieu liquide

	Méthode des proportions			Système MGIT 960 AST				
					Résultats de sensibilité		Résultats de résistance	
ANTI BIOTI QUE	Concen- tration	S	R	Concen- tration	Nb. concordances	% concordance (IC à 95 %)	Nb. concordances	% concordance (IC à 95 %)
STR	2,0 µg/mL	69	27	1,0 µg/mL	62	90 (80 à 96)	26	96 (81 à 100)
INH	0,2 µg/mL	59	37	0,1 µg/mL	57	97 (88 à 100)	36	97 (86 à 100)
RIF	1,0 µg/mL	72	24	1,0 µg/mL	71	99 (93 à 100)	24	100 (95 à 100)
EMB	5,0 µg/mL	91	20	5,0 µg/mL	88	97 (91 à 99)	17	85 (62 à 97)

Tous les isolats présentant des résultats **MGIT** discordants ont été testés par la méthode des proportions par deux centres indépendants. Parmi les sept isolats discordants pour la résistance à STR (R-960, S-MOP), trois isolats ont donné lieu à un résultat de résistance sur les deux sites et un isolat, à un résultat de sensibilité sur les deux sites. Pour les trois autres isolats, un résultat de résistance a été obtenu sur un site et un résultat de sensibilité sur l'autre site. Un résultat de sensibilité à été obtenu sur les deux sites pour l'isolat discordant pour la sensibilité à STR (S-960, R-MOP). Des résultats de sensibilité ont été obtenus sur les deux sites pour les deux isolats discordants pour la résistance à INH (R-960, S-MOP). Un résultat de sensibilité à été obtenu sur les deux sites pour l'isolat discordant pour la sensibilité à INH (S-960, R-MOP). Un résultat de résistance a été obtenu sur les deux sites pour l'isolat discordant pour la résistance à RIF (R-960, S-MOP). Des résultats de sensibilité ont été obtenus sur les deux sites pour les trois isolats discordants pour la résistance à EMB (R-960, S-MOP). Parmi les trois isolats discordants pour la sensibilité à EMB (S-960, R-MOP), deux isolats ont donné lieu à un résultat de sensibilité sur les deux sites et le troisième isolat, à un résultat de résistance sur un site et à un résultat de sensibilité sur l'autre site.

Tableau 3 : Résultat des isolats cliniques – BACTEC MGIT 960 AST comparé à la méthode des proportions à partir de cultures sur milieu solide

	Méthode des proportions			Système MGIT 960 AST				
ANTIBIOTIQUE	Concentration	S	R	Concentration	Résultats de sensibilité Nb. concordances	% concordance (IC à 95 %)	Résultats de résistance Nb. concordances	% concordance (IC à 95 %)
STR	2,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	65	93 (84 à 98)	28	97 (82 à 100)
INH	0,2 µg/mL	63	36	0,1 µg/mL	62	98 (92 à 100)	35	97 (86 à 100)
RIF	1,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	70	100 (95 à 100)	26	90 (73 à 98)
EMB	5,0 µg/mL	87	25	5,0 µg/mL	86	99 (94 à 100)	20	80 (59 à 93)

Tous les isolats présentant des résultats **MGIT** discordants ont été testés par la méthode des proportions par deux centres indépendants. Parmi les cinq isolats discordants pour la résistance à STR (R-960, S-MOP), deux isolats ont donné lieu à un résultat de résistance sur les deux sites et un isolat, à un résultat de sensibilité sur les deux sites. Pour les deux autres isolats, un résultat de résistance a été obtenu sur un site et un résultat de sensibilité sur l'autre site. Un résultat de résistance à été obtenu sur les deux sites pour l'isolat discordant pour la sensibilité à STR (S-960, R-MOP). Un résultat de sensibilité a été obtenu sur les deux sites pour l'isolat discordant pour la résistance à INH (R-960, S-MOP). Un résultat de résistance à été obtenu sur les deux sites pour l'isolat discordant pour la sensibilité à INH (S-960, R-MOP). Un résultat de sensibilité à été obtenu sur les deux sites pour les trois isolats discordants pour la sensibilité à RIF (S-960, R-MOP). Un résultat de résistance a été obtenu sur les deux sites pour l'isolat discordant pour la résistance à EMB (R-960, S-MOP). Un résultat de sensibilité à été obtenu sur les deux sites pour quatre des cinq isolats discordants pour la sensibilité à EMB (S-960, R-MOP). Pour le cinquième isolat, un résultat de résistance a été obtenu sur un site et un résultat de sensibilité sur l'autre site.

Le tableau 4 présente les résultats obtenus avec la streptomycine et l'isoniazide pour le test des isolats cliniques (concentration élevée) issus de cultures en milieu liquide. Le tableau 5 présente les résultats obtenus avec la streptomycine et l'isoniazide pour le test des isolats cliniques (concentration élevée) issus de cultures sur milieu solide.

Tableau 4 : Résultat des isolats cliniques – BACTEC MGIT 960 AST comparé à la méthode des proportions à partir de cultures en milieu liquide

	Méthode des proportions			Système MGIT 960 AST				
ANTIBIOTIQUE	Concentration	S	R	Concentration	Résultats de sensibilité Nb. concordances	% concordance (IC à 95 %)	Résultats de résistance Nb. concordances	% concordance (IC à 95 %)
STR	10,0 µg/mL	77	19	4,0 µg/mL	73*	95 (87 à 99)	17	90 (67 à 99)
INH	1,0 µg/mL	65	31	0,4 µg/mL	65*	100 (95 à 100)	29	94 (79 à 99)

* Suppose un résultat S pour la concentration élevée de l'antibiotique avec **MGIT**, pour tous les isolats ayant un résultat S pour la faible concentration de l'antibiotique avec **MGIT**.

Tous les isolats présentant des résultats **MGIT** discordants ont été testés par la méthode des proportions par deux centres indépendants. Des résultats de sensibilité ont été obtenus sur les deux sites pour les quatre isolats discordants pour la résistance à STR (R-960, S-MOP). Parmi les deux isolats discordants pour la sensibilité à STR (S-960, R-MOP), un isolat a donné lieu à un résultat de sensibilité sur les deux sites et l'autre isolat, à un résultat de résistance sur les deux sites. Parmi les deux isolats discordants pour la sensibilité à INH (S-960, R-MOP), un isolat a donné lieu à un résultat de sensibilité sur les deux sites et l'autre isolat, à un résultat de résistance sur les deux sites.

Tableau 5 : Résultat des isolats cliniques – BACTEC MGIT 960 AST comparé à la méthode des proportions à partir de cultures sur milieu solide

	Méthode des proportions			Système MGIT 960 AST				
ANTIBIOTIQUE	Concentration	S	R	Concentration	Résultats de sensibilité Nb. concordances	% concordance (IC à 95 %)	Résultats de résistance Nb. concordances	% concordance (IC à 95 %)
STR	10,0 µg/mL	78	21	4,0 µg/mL	73*	94 (86 à 98)	17	81 (58 à 95)
INH	1,0 µg/mL	68	31	0,4 µg/mL	68*	100 (95 à 00)	30	97 (83 à 100)

* Suppose un résultat S pour la concentration élevée de l'antibiotique avec **MGIT**, pour tous les isolats ayant un résultat S pour la faible concentration de l'antibiotique avec **MGIT**.

Tous les isolats présentant des résultats **MGIT** discordants ont été testés par la méthode des proportions par deux centres indépendants. Des résultats de sensibilité ont été obtenus sur les deux sites pour les cinq isolats discordants pour la résistance à STR (R-960, S-MOP). Parmi les quatre isolats discordants pour la sensibilité à STR (S-960, R-MOP), trois isolats ont donné lieu à un résultat de sensibilité sur les deux sites et le quatrième isolat à un résultat de résistance sur les deux sites. Un résultat de résistance à été obtenu sur les deux sites pour l'isolat discordant pour la sensibilité à INH (S-960, R-MOP).

CONDITIONNEMENT

Réf.	Description
245123	Trousse **BACTEC MGIT** 960 SIRE, coffret comprenant 4 flacons de complexe d'antibiotiques lyophilisés et 8 flacons de Supplément SIRE.
245125	Trousse **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0, coffret comprenant 1 flacon d'antibiotique lyophilisé et 2 flacons de Supplément SIRE.
245157	Trousse **BACTEC MGIT** 960 IR, coffret comprenant 2 flacons d'antibiotique lyophilisé et 4 flacons de Supplément SIRE.
245126	Trousse **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4, coffret comprenant 1 flacon d'antibiotique lyophilisé et 2 flacons de Supplément SIRE.

REFERENCES: Voir la section « References » dans la notice en anglais.

BD BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit

Zur Empfindlichkeitsprüfung von *Mycobacterium tuberculosis* gegen Antituberkulotika

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Das **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkit ist ein qualitatives Schnellverfahren zur Empfindlichkeitsprüfung von *Mycobacterium tuberculosis* aus Kulturen gegen Streptomycin (STR), Isoniazid (INH), Rifampin (RIF) und Ethambutol (EMB). Das **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0-Testkit und das **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4-Testkit sind zur Empfindlichkeitsprüfung bei höheren Arzneimittelkonzentrationen vorgesehen.

Die **BACTEC MGIT** 960-Testkits zur Empfindlichkeitsprüfung werden mit dem **BACTEC MGIT** 960- und **BACTEC MGIT** 320-System.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Zur ordnungsgemäßen Behandlung von Tuberkulose-Patienten sind Empfindlichkeitsprüfungen gegen Antituberkulotika unerläßlich. Tuberkulose wird normalerweise mit einer Kombination von Antituberkulotika wie Streptomycin, Isoniazid, Rifampin und Ethambutol behandelt. Dabei ist wichtig, daß die angewendeten Antituberkulotika eine ausreichende Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis* aufweisen, d. h., das Bakterienisolat muß gegen das Arzneimittel empfindlich sein.

Mycobacterium tuberculosis mit Mehrfachresistenz (MDR-TB) hat sich in letzter Zeit zu einem schwerwiegenden öffentlichen Gesundheitsproblem entwickelt.[1] Resistenz gegen eines der Primärtherapeutika Streptomycin (STR), Isoniazid (INH), Rifampin (RIF) und Ethambutol (EMB) erschwert die Behandlung der Erkrankung und führt zu höheren Kosten. Der schnelle Nachweis dieser resistenten Isolate ist von maßgeblicher Bedeutung für eine wirksame Behandlung des Patienten.

Zur Empfindlichkeitsprüfung von Mykobakterien finden zwei Methoden breite Anwendung. Bei der ersten Methode, als Proportionsmethode[2] bekannt, wird Middlebrook- und Cohn-7H10-Agar verwendet. Dabei werden Koloniezahlen auf

Medien mit und ohne Arzneimittel verglichen. Resistenz gegen ein Arzneimittel ist nachgewiesen, wenn mindestens 1 % der Bakterienpopulation gegen die im Test verwendete Arzneimittelkonzentration resistent ist. Ergebnisse liegen im allgemeinen nach 21tägiger Inkubation vor. Die zweite Methode, als **BACTEC** 460TB radiometrische Empfindlichkeitsmethode[3] bekannt, dauert normalerweise 4 bis 12 Tage. Diese Methode beruht auf der Produktion von radioaktivem ^{14}C-markiertem Kohlendioxid durch die wachsenden Mykobakterien, was durch die Zunahme des Wachstumsindex im System angezeigt wird.

Bei der Proportionsmethode wird die Empfindlichkeitsprüfung von *Mycobacterium tuberculosis* herkömmlicherweise mit zwei Antibiotikakonzentrationen durchgeführt. Das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, ehemals NCCLS) empfiehlt weiterhin, bei Anwendung der Proportionsmethode zwei Konzentrationen der Primärarzneimittel (außer Rifampin) zu verwenden. Die für die Proportionsmethode empfohlenen niedrigen Konzentrationen sind die kritischen Konzentrationen für diese Arzneimittel. Die kritische Konzentration ist die Arzneimittelkonzentration, bei der ein Isolat entweder als resistent oder empfindlich eingestuft werden kann. Ein Isolat wird als resistent eingestuft, wenn mindestens 1 % der Testpopulation in Gegenwart der kritischen Konzentration des Arzneimittels wächst. Die hohe Arzneimittelkonzentration wird zur Erstellung eines Resistenzprofils innerhalb der Population verwendet. Anhand dieses Ergebnisses kann der Arzt entscheiden, ob eine Anpassung der Arzneimitteltherapie erforderlich ist.

Der **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Test liefert die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung etwa im gleichen Zeitraum wie das **BACTEC** 460TB-System. Außerdem ist diese Methode nicht-radiometrisch, und die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung liegen in den meisten Fällen früher als bei der Proportionsmethode vor.

Bei der Entwicklung des **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Tests wurden die kritischen Konzentrationen für Streptomycin, Isoniazid, Rifampin und Ethambutol etwas niedriger angesetzt als die kritischen Konzentrationen der Proportionsmethode, um zu vermeiden, daß Isolate fälschlicherweise als empfindlich beurteilt werden. Dies gilt besonders für Streptomycin, bei dem viele Isolate nahe an der für die Proportionsmethode empfohlenen kritischen Konzentration liegen. Aus diesem Grund wurde für Streptomycin und Isoniazid eine zweite, höhere Konzentration angesetzt. Wenn ein Isolat bei der kritischen Konzentration als „empfindlich" getestet wird, kann dieser Befund ausgegeben werden, und weitere Untersuchungen sind nicht erforderlich. Isolate, die bei der kritischen Konzentration von Streptomycin, Isoniazid und/oder Ethambutol resistent sind, sollten entweder mit dem **BACTEC MGIT**-System oder einer alternativen Methode bei einer höheren Arzneimittelkonzentration getestet werden. In diesem Fall kann der Befund als „resistent bei kritischer Konzentration" ausgegeben werden, mit dem Vermerk, daß eine zusätzliche Prüfung bei einer höheren Konzentration durchgeführt wird.

Die Testung von resistenten Isolaten bei einer höheren Konzentration ist wichtig für die Identifizierung von Isolaten mit geringer Resistenz, d. h. Isolaten, die bei der kritischen Konzentration resistent und bei der hohen Konzentration empfindlich sind. Die hohen Konzentrationen im **BACTEC MGIT**-System wurden niedriger angesetzt als die Konzentrationen, die bei der Proportionsmethode Anwendung finden. Aufgrund dieser Konfiguration des **BACTEC MGIT**-Systems korreliert das Ergebnis „resistent" (insbesondere bei Streptomycin) ggf. nicht immer mit einem Resistenzbefund, der bei der hohen Konzentration mit der Proportionsmethode erzielt wurde. Falls ein Isolat bei der hohen Konzentration von Streptomycin als „resistent" getestet wird, sollte es anhand einer alternativen Methode bei der gleichen Konzentration getestet werden.

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Das **BBL MGIT** 7-mL-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum enthält eine modifizierte Middlebrook-7H9-Bouillon, die das Wachstum und den Nachweis von Mykobakterien fördert (siehe Packungsbeilage für das **BBL MGIT** 7-mL-Indikatorröhrchen). Das **MGIT**-Indikatorröhrchen ist ein 16 x 100-mm-Röhrchen, in dessen rundem Boden eine fluoreszierende Verbindung in Silikon eingebettet ist. Die fluoreszierende Verbindung spricht auf das Vorliegen von in der Bouillon aufgelöstem Sauerstoff an. Anfänglich ist nur wenig Fluoreszenz nachweisbar, da der aufgelöste Sauerstoff die Emissionen der Verbindung absorbiert. Später nehmen die aktiv wachsenden und respirierenden Mikroorganismen den Sauerstoff auf und ermöglichen die Fluoreszenz der Verbindung.

Das **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkit ist ein qualitativer Test, der 4 – 13 Tage dauert. Der Test basiert auf dem Vergleich des Wachstums eines *M. tuberculosis*-Isolats in einem arzneimittelhaltigen gegenüber einem arzneimittelfreien Röhrchen (Wachstumskontrolle). Das **BACTEC MGIT**-Gerät kontrolliert die Röhrchen auf zunehmende Fluoreszenz. Die Empfindlichkeit bzw. Resistenz wird vom Gerät anhand einer Fluoreszenzanalyse im arzneimittelhaltigen Röhrchen im Vergleich zur Fluoreszenz im Wachstumskontrollröhrchen bestimmt.

Das **BACTEC MGIT**-Gerät interpretiert diese Ergebnisse automatisch und gibt das Testergebnis „empfindlich" oder „resistent" aus.

REAGENZIEN

Das **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkit enthält jeweils ein Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin, Isoniazid, Rifampin und Ethambutol sowie acht Fläschchen SIRE-Supplement.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Streptomycin .... 332 µg

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Isoniazid .... 33,2 µg

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Rifampin .... 332 µg

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Ethambutol .... 1660 µg

Das **BACTEC MGIT** 960 IR-Testkit enthält jeweils ein Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid und Rifampin sowie vier Fläschchen SIRE-Supplement.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Isoniazid .... 33,2 µg

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Rifampin .... 332 µg

Das **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0-Testkit enthält ein Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin und zwei Fläschchen SIRE-Supplement.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Streptomycin .... 664 µg

Das **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4-Testkit enthält ein Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid und zwei Fläschchen SIRE-Supplement.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Isoniazid .... 66,4 µg

Die **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Supplement enthält 20 mL Middlebrook-OADC-Anreicherung.

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertes Wasser

Rinderalbumin .... 50,0 g   Katalase .... 0,03 g
Dextrose .... 20,0 g   Ölsäure .... 0,6 g

**Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.*

Aufbewahrung und Rekonstituierung der Reagenzien: BACTEC MGIT 960 SIRE-Arzneimittelfläschchen – Fläschchen mit lyophilisiertem Arzneimittel nach Erhalt bei 2 – 8 °C aufbewahren. Rekonstituierte Antibiotikalösungen können eingefroren und bei mindestens -20 °C bis zu sechs Monate, jedoch nicht über das ursprüngliche Verfallsdatum hinaus, aufbewahrt werden. Aufgetaute Lösungen müssen sofort verwendet werden. Nicht verwendete Anteile verwerfen.

BACTEC MGIT SIRE-Supplement – Nach Erhalt bei 2 – 8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder erhitzen. Vor dem Verfallsdatum öffnen und verwenden. Vor Lichteinwirkung schützen.

Gebrauchsanleitung:

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin im **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkit mit **4 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 83 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid im **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkit mit **4 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 8,3 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Rifampin im **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkit mit **4 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 83 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Ethambutol im **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkit mit **4 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 415 µg/mL herzustellen.

HINWEIS: Die folgenden Reagenzien werden mit einer anderen Wassermenge rekonstituiert. Wenn zur Rekonstituierung der höheren Arzneimittelkonzentrationen nicht die korrekte Menge sterilen destillierten Wassers verwendet wird, sind die Testergebnisse ungültig.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin im **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0-Testkit mit **2 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 332 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid im **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4-Testkit mit **2 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 33,2 µg/mL herzustellen.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

In-vitro-Diagnostikum.

POTENTIELL INFEKTIÖSE TESTPROBE: Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen"[4-7] sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.

Beim Umgang mit *M. tuberculosis*-Kulturen sind Laborpraktiken, Sicherheitsvorkehrungen und-anlagen der Biosicherheitsstufe 3 erforderlich.

Die Anleitungen in allen zutreffenden Packungsbeilagen, einschließlich des **BBL MGIT** 7-mL-Indikatorröhrchens für Mykobakterienwachstum, durchlesen und befolgen.

Röhrchen und Fläschchen vor Gebrauch auf Anzeichen von Kontamination oder Beschädigung untersuchen. Röhrchen oder Fläschchen, die unbrauchbar erscheinen, verwerfen. Röhrchen, die fallengelassen wurden, sorgfältig untersuchen. Bei Anzeichen von Beschädigungen das betreffende Röhrchen verwerfen.

Beim Bruch eines Röhrchens: 1) Geräteschubladen schließen; 2) Gerät ausschalten; 3) betroffenen Bereich unverzüglich verlassen; 4) vom Labor empfohlene Maßnahmen ergreifen. Ein undichtes bzw. zerbrochenes inokuliertes Röhrchen kann ein Mykobakterien-Aerosol erzeugen; entsprechende Richtlinien zur Handhabung beachten.

Alle inokulierten **MGIT**-Röhrchen vor dem Verwerfen autoklavieren.

VORBEREITUNG DES INOKULUMS

Alle nachstehenden Vorbereitungsschritte müssen mit Reinkulturen von *M. tuberculosis* durchgeführt werden. Das jeweilige Labor muß anhand geeigneter Identifizierungsmethoden bestätigen, daß das zu testende Isolat eine Reinkultur von *M. tuberculosis* ist.

Das Inokulum kann aus festen Medien oder aus einem positiven **BACTEC MGIT** 7-mL-Röhrchen vorbereitet werden. Außerdem können in flüssigen und festen Medien angelegte Kulturen zur Vorbereitung eines **MGIT**-Inokulumröhrchens verwendet werden. Dieses kann anschließend wiederum zur Vorbereitung des Inokulums genutzt werden. Die einzelnen Möglichkeiten werden weiter unten beschrieben.

Vorbereitung des Inokulums aus festen Medien:

HINWEIS: Das Inokulum muß in Übereinstimmung mit den nachstehenden Anleitungen vorbereitet werden, um die ordnungsgemäße Organismenkonzentration für die Empfindlichkeitsprüfung zu erhalten.

1. Ein steriles 16,5 x 128-mm-Röhrchen mit Kappe, das 8–10 Glasperlen enthält, mit 4 mL **BBL** Middlebrook-7H9-Bouillon (oder **BBL MGIT-**Bouillon) beschicken.
2. Von einer bis zu 14 Tage alten Kultur möglichst viele Kolonien mit einer sterilen Öse abschaben und dabei nach Möglichkeit kein festes Medium mitaufnehmen. Die Kolonien in der Middlebrook-7H9-Bouillon suspendieren.
3. Suspension 2 – 3 min in einem Vortexmischer mischen, um größere Klumpen aufzubrechen. Die Suspension sollte eine Trübung von über 1,0 McFarland aufweisen.
4. Suspension 20 min ungestört stehen lassen.
5. Den Überstand in ein weiteres steriles 16,5 x 128-mm-Röhrchen mit Kappe überführen (dabei Überführen des Sediments vermeiden) und weitere 15 min stehen lassen.
6. Den Überstand (der gleichmäßig aussehen und keine Klumpen enthalten sollte) in ein drittes steriles 16,5 x 128-mm-Röhrchen überführen. HINWEIS: Die Bakteriensuspension sollte bei diesem Schritt eine Trübung von über 0,5 McFarland aufweisen.
7. Suspension visuell auf einen McFarland-Standard von 0,5 einstellen. Nicht auf einen McFarland-Standard unter 0,5 einstellen.
8. 1,0 mL der eingestellten Suspension in 4 mL steriler Kochsalzlösung verdünnen (1:5-Verdünnung). Mit dem „Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung" fortfahren.

Vorbereitung des Inokulums aus einem positiven BACTEC MGIT 7-mL-Röhrchen:

HINWEIS: Das Inokulum muß in Übereinstimmung mit den nachstehenden Zeitangaben zubereitet werden, um die ordnungsgemäße Organismenkonzentration für die Empfindlichkeitsprüfung zu erhalten.

1. Der erste Tag, an dem ein **MGIT**-Röhrchen vom Gerät als positiv ausgegeben wird, gilt als Tag 0.

2. Zur Vorbereitung des Testinokulums sollte ein positives **MGIT** 7-mL-Röhrchen vom ersten Tag nach dem Positivwerden im **BACTEC MGIT**-Gerät (Tag 1) bis einschließlich zum fünften Tag (Tag 5) verwendet werden. Von einem Röhrchen, das länger als fünf Tage positiv war, sollte eine Subkultur in einem neuen **MGIT** 7-mL-Röhrchen mit **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement angelegt werden. Die Subkultur sollte dann im **BACTEC MGIT**-Gerät bis zum Positivwerden getestet und innerhalb von ein bis fünf Tagen nach Auftreten einer Positivität verwendet werden. Siehe „Vorbereitung eines **MGIT**-Inokulumröhrchens aus flüssigen Medien".
3. Wenn das Röhrchen an Tag 1 oder Tag 2 positiv ist, die **MGIT**-Bouillonsuspension zur Inokulation verwenden. Gut durchmischen. Mit dem „Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung" fortfahren.
4. Wenn das Röhrchen an Tag 3, 4 oder 5 positiv wird, den Inhalt gut mischen und 1 mL der positiven Bouillon in 4 mL steriler Kochsalzlösung verdünnen (1:5-Verdünnung). Den Röhrcheninhalt gut durchmischen. Die verdünnte Suspension zur Inokulation verwenden. Mit dem „Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung" fortfahren.

Vorbereitung eines MGIT-Inokulumröhrchens aus flüssigen Medien

1. Den Röhrcheninhalt durch Umdrehen bzw. mit dem Vortex-Mischer mischen.
2. Eine 1:100-Verdünnung herstellen, indem Sie 0,1 mL der Kultur zu 10 mL **BBL** Middlebrook-7H9-Bouillon bzw. **BBL MGIT**-Bouillon zugeben. Gut durchmischen.
3. 0,5 mL dieser Suspension in ein **MGIT** 7-mL-Röhrchen zugeben, dem 0,8 mL **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement zugesetzt sind.
4. Dicht verschließen und durch zwei- bis dreimaliges Umdrehen vorsichtig mischen.
5. Das Röhrchen in ein **BACTEC MGIT**-Gerät geben und testen, bis Sie ein positives Ergebnis erhalten.

   HINWEIS: Für die Verwendung als AST-Inokulum gilt: Bis zu einem positiven Testergebnis **müssen** mindestens 4 Tage vergehen. Falls ein positives Ergebnis in weniger als 4 Tagen feststeht, zu Schritt 1 zurückkehren und ein neues Inokulumröhrchen vorbereiten.
6. Dieses Röhrchen kann nun bis zu fünf Tagen nach Feststellen eines positiven Ergebnisses verwendet werden. Mit der oben beschriebenen „Vorbereitung des Inokulums aus einem positiven **BACTEC MGIT** 7-mL-Röhrchen" fortfahren.

Vorbereitung eines MGIT-Inokulumröhrchens aus festen Medien

1. Eine sterile Öse verwenden und das Wachstum von der Schräge schaben. In ein **MGIT** 7-mL-Röhrchen geben, dem 0,8 mL **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement zugesetzt wurden.
2. Dicht verschließen und durch zwei- bis dreimaliges Umdrehen vorsichtig mischen.
3. Das Röhrchen in ein **BACTEC MGIT**-Gerät geben und testen, bis Sie ein positives Ergebnis erhalten.

   HINWEIS: Für die Verwendung als AST-Inokulum gilt: Bis zu einem positiven Testergebnis **müssen** mindestens 4 Tage vergehen. Falls ein positives Ergebnis in weniger als 4 Tagen feststeht, zu Schritt 1 zurückkehren und ein neues Inokulumröhrchen vorbereiten.
4. Dieses Röhrchen kann nun bis zu fünf Tagen nach Feststellen eines positiven Ergebnisses verwendet werden. Mit der oben beschriebenen „Vorbereitung des Inokulums aus einem positiven **BACTEC MGIT** 7-mL-Röhrchen" fortfahren.

VERFAHREN

Mitgelieferte Materialien: BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit mit je einem Fläschchen der lyophilisierten Arzneimittel sowie acht Fläschchen SIRE-Supplement (etwa 40 Tests pro Arzneimittel pro Testkit). Das **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0-Testkit enthält je ein Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel und zwei Fläschchen SIRE-Supplement (etwa 20 Tests pro Kit). Das **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4-Testkit enthält je ein Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel und zwei Fläschchen SIRE-Supplement (etwa 20 Tests pro Kit).

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: BBL MGIT 7-mL-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und die für dieses Verfahren benötigten Laborutensilien.

Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung mit dem BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit:

1. Für jedes Testisolat fünf **MGIT** 7-mL-Röhrchen beschriften. Ein Röhrchen mit WK (Wachstumskontrolle), eines mit STR, eines mit INH, eines mit RIF und eines mit EMB beschriften. Die Röhrchen in der richtigen Anordnung in einen AST-

Röhrchenständer geeigneter Größe stellen (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Geräts).

2. Jedes Röhrchen aseptisch mit 0,8 mL **BACTEC MGIT** SIRE-Supplement beschicken. **HINWEIS:** Die Verwendung der mit dem Testkit gelieferten Supplement ist wichtig.
3. Mit einer Mikropipette 100 µL der 83 µL/mL **MGIT** STR-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen pipettieren. 100 µL der 8,3 µg/mL **MGIT** INH-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete **MGIT-**Röhrchen pipettieren. 100 µL der 83 µg/mL **MGIT** RIF-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen pipettieren. 100 µL der 415 µg/mL **MGIT** EMB-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen pipettieren. Die Zugabe des korrekten Arzneimittels zum entsprechenden Röhrchen ist wichtig. Dem **MGIT** WK-Röhrchen dürfen keine Antibiotika zugesetzt werden.

Arzneimittel	**Konzentration des Arzneimittels nach der Rekonstituierung***	**Den MGIT-Röhrchen zugegebene Volumina**	**Endkonzentration in den MGIT-Röhrchen**
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1 µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0 µg/mL

* Diese Arzneimittel müssen mit **4 mL** sterilem/deionisiertem Wasser rekonstituiert werden, um die angegebenen Konzentrationen zu erhalten.

4. **Vorbereitung und Inokulation des Wachstumskontrollröhrchens:** Zur Zubereitung der 1:100 verdünnten Wachstumskontrollsuspension 0,1 mL der Bakteriensuspension (siehe **„VORBEREITUNG DES INOKULUMS“**) aseptisch in 10 mL sterile Kochsalzlösung pipettieren. Die Wachstumskontrollsuspension gründlich durchmischen. Das mit „WK“ beschriftete **MGIT**-Röhrchen mit **0,5** mL der 1:100 verdünnten Wachstumskontrollsuspension inokulieren.
5. **Inokulation der arzneimittelhaltigen Röhrchen:** 0,5 mL der Bakteriensuspension (siehe **„VORBEREITUNG DES INOKULUMS“**) aseptisch in jedes der VIER verbleibenden Röhrchen (STR, INH, RIF, EMB) pipettieren.
6. Die Röhrchen wieder fest verschließen. Den Inhalt der Reagenzgläser durch drei- bis viermaliges vorsichtiges Umdrehen gründlich mischen.
7. Den AST-Ansatz mit Hilfe der AST-Eingabefunktion in das **BACTEC MGIT**-Gerät eingeben (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Geräts). Sicherstellen, daß die Anordnung der Röhrchen im AST-Röhrchenständer mit der bei der Eingabe gewählten Konfiguration übereinstimmt.
8. 0,1 mL der Bakteriensuspension auf einer **Trypticase** Soja-Agarplatte mit 5 % Schafblut (TSA II) ausstreichen. Platte in einen Plastikbeutel einschließen. Bei 35–37 °C inkubieren.
9. Die Blutagarplatte nach 48 h auf bakterielle Kontamination untersuchen. Wenn die Blutagarplatte kein Wachstum aufweist, die Empfindlichkeitsprüfung fortsetzen. Wenn die Blutagarplatte Wachstum aufweist, den AST-Ansatz verwerfen (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Geräts) und den Test mit einer Reinkultur wiederholen.

Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung mit dem BACTEC MGIT 960 STR 4.0- und INH 0.4-Testkit:

Wenn bei der kritischen Konzentration eine Resistenz nachgewiesen wird, sollte ein Empfindlichkeitsprofil erstellt werden, bei dem zumindest die hohe Konzentration des Arzneimittels geprüft wird, gegen das der Organismus ursprünglich resistent war:

Isolatquelle: Das für diesen Test verwendete Isolat muß nach den Anleitungen unter **„VORBEREITUNG DES INOKULUMS“** zubereitet werden. Zur Zubereitung eines Inokulumröhrchens können 0,5 mL des Isolats aus dem arzneimittelfreien Wachstumskontrollröhrchen des zuvor getesteten AST-Ansatzes in ein neues **MGIT** 7-mL-Röhrchen mit **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement überimpft werden. Wenn das Inokulumröhrchen im Gerät positiv ist, mit den Anleitungen unter **„VORBEREITUNG DES INOKULUMS:** Vorbereitung aus einem positiven **MGIT-**Röhrchen“ fortfahren.

1. Eine ausreichende Anzahl von **MGIT** 7-mL-Röhrchen für das Testisolat beschriften, so daß für jedes Antibiotikum ein **MGIT**-WK-Röhrchen und ein **MGIT-**Arzneimittelröhrchen zur Verfügung steht. Die Röhrchen in der richtigen Anordnung in einen AST-Röhrchenständer geeigneter Größe stellen (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Geräts).
2. Jedes Röhrchen aseptisch mit 0,8 mL **BACTEC MGIT** SIRE-Supplement beschicken. HINWEIS: Die Verwendung der mit dem Kit gelieferten Supplement ist wichtig.

3. Mit einer Mikropipette 100 µL der Arzneimittel-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen pipettieren. Die Zugabe des korrekten Arzneimittels zum entsprechenden Röhrchen ist wichtig. Dem **MGIT**-WK-Röhrchen dürfen keine Antibiotika zugesetzt werden.

Arzneimittel	**Konzentration des Arzneimittels nach der Rekonstituierung***	**Den MGIT-Röhrchen zugegebene Volumina**	**Endkonzentration in den MGIT-Röhrchen**
MGIT STR 4,0	332 µg/mL	100 µL	4,0 µg/mL
MGIT INH 0,4	33,2 µg/mL	100 µL	0,4 µg/mL

* Diese Arzneimittel müssen mit **2 mL** sterilem/deionisiertem Wasser rekonstituiert werden, um die angegebene Konzentration zu erhalten.

4. **Vorbereitung und Inokulation des Wachstumskontrollröhrchens:** Zur Zubereitung der 1:100 verdünnten Wachstumskontrollsuspension 0,1 mL der Bakteriensuspension (siehe **„VORBEREITUNG DES INOKULUMS“**) aseptisch in 10 mL sterile Kochsalzlösung pipettieren. Die Wachstumskontrollsuspension gründlich durchmischen. Das mit „WK“ beschriftete = **MGIT**-Röhrchen mit **0,5** mL der 1:100 verdünnten Wachstumskontrollsuspension inokulieren.
5. **Inokulation der arzneimittelhaltigen Röhrchen:** 0,5 mL der Bakteriensuspension (siehe **„VORBEREITUNG DES INOKULUMS“**) aseptisch in jedes der arzneimittelhaltigen Röhrchen pipettieren.
6. Die Röhrchen wieder fest verschließen. Den Inhalt der Reagenzgläser durch drei- bis viermaliges vorsichtiges Umdrehen gründlich mischen.
7. Den AST-Ansatz mit Hilfe der AST-Eingabefunktion in das **BACTEC MGIT**-Gerät eingeben (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Geräts). Sicherstellen, daß die Anordnung der Röhrchen im AST-Röhrchenständer mit der bei der Eingabe gewählten Konfiguration übereinstimmt.
8. 0,1 mL der Bakteriensuspension auf einer **Trypticase** Soja-Agarplatte mit 5 % Schafblut (TSA II) ausstreichen. Platte in einen Plastikbeutel einschließen. Bei 35 – 37 °C inkubieren.
9. Die Blutagarplatte nach 48 h auf bakterielle Kontamination untersuchen. Wenn die Blutagarplatte kein Wachstum aufweist, die Empfindlichkeitsprüfung fortsetzen. Wenn die Blutagarplatte Wachstum aufweist, den AST-Ansatz verwerfen (siehe **BACTEC MGIT**-Benutzerhandbuch) und den Test mit einer Reinkultur wiederholen.

HINWEIS: Die Empfindlichkeitsprüfung kann in verschiedenen Formaten konfiguriert werden. So kann zum Beispiel ein Testansatz für einen Röhrchenständer mit 5 Röhrchen, die nur die kritischen Konzentrationen enthalten, im System konfiguriert werden. Abhängig von den durchgeführten optionalen Profiltests können Testansätze für verschiedene andere Röhrchenständer konfiguriert werden (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Geräts).

Qualitätssicherung durch den Anwender: Es wird empfohlen, bei Erhalt einer neuen Sendung oder Chargennummer von **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Teströhrchen, den nachstehend aufgeführten Kontrollorganismus zu testen. Der Kontrollorganismus sollte eine Reinkultur sein, die in Übereinstimmung mit den Anleitungen unter **„VORBEREITUNG DES INOKULUMS“** angelegt werden sollte.

Der AST-Qualitätskontrollansatz sollte in Übereinstimmung mit den Anleitungen unter „Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung“ für die getesteten Arzneimittelkits vorbereitet werden. Bei der Vorbereitung des AST-Qualitätskontroll-ansatzes muß auf die ordnungsgemäße Rekonstituierung der lyophilisierten Arzneimittel und die korrekte Verdünnung der Qualitätskontrollorganismen für die Wachstums-und Arzneimittelröhrchen geachtet werden.

Die Zugabe des korrekten Arzneimittels zum entsprechenden gekennzeichneten Röhrchen ist wichtig. Bei Verwendung des pan-empfindlichen Qualitätskontrollorganismus wird nicht erkannt, ob ein inkorrektes Arzneimittel in die AST-Röhrchen pipettiert wurde.

Wenn die nachstehend aufgeführten korrekten Ergebnisse innerhalb von 4 – 13 Tagen erzielt werden, können die **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkits zur Prüfung von Patientenisolaten verwendet werden. Sollten die korrekten Ergebnisse nicht erzielt werden, ist der Test zu wiederholen. Wenn die korrekten Ergebnisse nach nochmaligem Testen nicht erzielt werden, das Testkit nicht verwenden und eine Becton Dickinson-Vertretung verständigen.

Stämme	WK	MGIT STR	MGIT INH	MGIT RIF	MGIT EMB
M. tuberculosis ATCC 27294	Positiv	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich

Stämme	WK	MGIT STR 4.0	MGIT INH 0.4
M. tuberculosis ATCC 27294	Positiv	Empfindlich	Empfindlich

Der gleiche Kontrollorganismus sollte bei der Durchführung von Empfindlichkeitsprüfungen einmal wöchentlich als Qualitätskontrolle getestet werden. Wenn die Qualitätskontrolle scheitert, dürfen die in dieser Testperiode erzielten Patientenergebnisse für die betreffenden Arzneimittel nicht berichtet werden. Den Qualitätskontrolltest für die betreffenden Arzneimittel und Patientenisolate wiederholen. Wenn der Qualitätskontrolltest erneut scheitert, können die Patientenergebnisse nicht berichtet werden. Das Testkit nicht verwenden und eine Becton Dickinson-Vertretung verständigen.

Bei der externen Beurteilung der **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkits waren die häufigsten Ursachen für das Scheitern von Qualitätskontrolltests kontaminierte Qualitätskontrollkulturen, über-/unterinokulierte AST-Ansätze, Arzneimittel, die nicht den korrekten Röhrchen zugegeben wurden, und Gerätefehler.

ERGEBNISSE

Das **BACTEC MGIT**-Gerät kontrolliert AST-Ansätze, bis ein Isolat als „empfindlich" oder „resistent" beurteilt wird. Sobald die Ansätze durchgetestet sind, werden die Ergebnisse vom **BACTEC MGIT**-Gerät ausgegeben (siehe Benutzerhandbuch des **BACTEC MGIT**-Geräts). Das **BACTEC MGIT**-Gerät gibt das Ergebnis eines AST-Ansatzes als Fehler (X) aus (ohne Beurteilung der Empfindlichkeit), wenn bestimmte Bedingungen auftreten, die das Testergebnis beeinträchtigen könnten. Bedingungen, die zu einem Fehlerergebnis (X) führen können, sind in Kapitel 7, Fehlersuche, des **BACTEC MGIT**-Gerät-Benutzerhandbuchs aufgeführt.

Im Befundbericht sind folgende Angaben einzuschließen: Testmethode, Name und Konzentration des Arzneimittels und ob das Ergebnis mit dem **BACTEC MGIT**-Gerät-System oder einer alternativen Methode erzielt wurde. Zur Auswahl der geeigneten Arzneimittel und deren Dosierung sollte der Facharzt für Lungen- oder Infektionskrankheiten der entsprechenden Fachabteilung hinzugezogen werden.

Bei unerwarteten Resistenzbefunden muß bestätigt werden, daß es sich bei dem getesteten Isolat tatsächlich um *M. tuberculosis* handelt. Sicherstellen, daß eine Reinkultur verwendet wurde, um das Vorliegen gemischter Mykobakterien usw. auszuschließen. Eine Monoresistenz gegenüber Ethambutol ist ungewöhnlich und sollte bestätigt werden.[2,8]

Befundbericht für den BACTEC MGIT 960 SIRE-Test bei der kritischen Konzentration

Arzneimittel (Konzentration)	MGIT-System Ergebnis	Empfohlener Bericht	Maßnahmen
STR (1,0 µg/mL) INH (0,1 µg/mL) RIF (1,0 µg/mL) EMB (5,0 µg/mL)	Empfindlich (SIRE)	Isolat mit dem **BACTEC MGIT**-System [Arzneimittel/Konzentration] getestet. Ergebnis: empfindlich	Keine Maßnahmen.
	Resistent (SIR)	Isolat mit dem **BACTEC MGIT**-System [Arzneimittel/Konzentration] getestet. Ergebnis: resistent Ergebnisse der [Arzneimittel]-Testung bei höherer Konzentration folgen (falls durchgeführt).	Testung bei der höheren Konzentration (STR und/oder INH) empfohlen.
	Resistent (E)	Falls nicht nur gegenüber Ethambutol (EMB) resistent: Isolat mit dem **BACTEC MGIT**-System [Ethambutol 5,0 µg/mL] getestet. Ergebnis: resistent. Labor bzgl. EMB-Testung bei einer höheren Konzentration konsultieren.	EMB-Testung bei höherer Konzentration anhand einer alternativen Methode empfohlen.
		Falls mono-resistent gegenüber Ethambutol (EMB): Isolat mit dem **BACTEC MGIT**-System [Ethambutol 5,0 µg/mL] getestet. Ergebnis: resistent Mono-Resistenz gegenüber Ethambutol ist ungewöhnlich. Labor bzgl. Bestätigung konsultieren.	EMB-Testung sowohl bei der kritischen als auch bei der höheren Konzentration anhand einer alternativen Methode empfohlen.
	Fehler (X)	Kein Bericht.	Test wiederholen.

Befundbericht für BACTEC MGIT 960 STR 4.0 und INH 0.4

Arzneimittel (Konzentration)	MGIT-System Ergebnis	Empfohlener Bericht	Maßnahmen
STR (4,0 µg/mL)	Empfindlich	Isolat mit dem **BACTEC MGIT**-System Streptomycin bei 4,0 µg/mL getestet. Ergebnis: empfindlich Resistenz bei 1,0 µg/mL und Empfindlichkeit bei 4,0 µg/mL deuten auf eine geringe Resistenz dieses Isolats gegenüber Streptomycin hin.	Keine Maßnahmen.
	Resistent	Isolat mit dem **BACTEC MGIT**-System Streptomycin bei 4,0 µg/mL getestet. Ergebnis: resistent Labor bzgl. Bestätigung konsultieren.	Isolat sollte anhand einer alternativen Methode getestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen.
	Fehler (X)	Kein Bericht·	Test wiederholen.
INH (0,4 µg/mL)	Empfindlich	Isolat mit dem **BACTEC MGIT**-System Isoniazid bei 0,4 µg/mL getestet. Ergebnis: empfindlich Resistenz bei 0,1 µgmL und Empfindlichkeit bei 0,4 µg/mL deuten auf eine geringe Resistenz dieses Isolats gegenüber Isoniazid hin.	Keine Maßnahmen.
	Resistent	Isolat mit dem **BACTEC MGIT**-System Isoniazid bei 0,4 µg/mL getestet. Ergebnis: resistent.	Keine Maßnahmen.
	Fehler (X)	Kein Bericht.	Test wiederholen.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Der **BACTEC MGIT**-System-Empfindlichkeitstest beurteilt nicht den Empfindlichkeitsgrad des getesteten Isolats. Die Ergebnisse werden entweder als S (empfindlich) oder R (resistent) für das getestete Arzneimittel und die Konzentration ausgegeben.

Bei der Entwicklung des **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Tests wurden die kritischen Konzentrationen für Streptomycin, Isoniazid, Rifampin und Ethambutol etwas niedriger angesetzt als die kritischen Konzentrationen der Proportionsmethode, um zu vermeiden, daß Isolate fälschlicherweise als empfindlich beurteilt werden. Die empfohlene Testung der höheren Konzentrationen verbessert den Nachweis von Isolaten mit geringer Resistenz.

Die **BACTEC MGIT**-System-Empfindlichkeitstests können nur auf einem **BACTEC MGIT**-Gerät durchgeführt werden. Die AST-Ansätze können nicht manuell abgelesen werden.

Nur Reinkulturen von *M. tuberculosis* verwenden. Kontaminierte Kulturen oder Kulturen mit mehreren Mykobakterien-Spezies können zu falschen Ergebnissen führen und sollten nicht getestet werden. Die direkte Testung von klinischen Proben wird nicht empfohlen.

Aus festen Medien zubereitete Suspensionen müssen sich vor der Standardisierung die vorgeschriebene Zeit absetzen. Inokula, die aus festen Medien zubereitet wurden, sollten visuell auf eine Trübung von 0,5 McFarland eingestellt werden; andernfalls können falsche Ergebnisse erzielt oder AST-Ansatzfehler verursacht werden.

Wenn zur Inokulation des Arzneimittelröhrchens an entsprechender Stelle keine 1:5-Verdünnung der Bakteriensuspension verwendet wird, können falsche Ergebnisse erzielt werden.

Wenn zur Inokulation des Wachstumskontrollröhrchens keine 1:100-Verdünnung der Bakteriensuspension verwendet wird, können falsche Ergebnisse erzielt oder AST-Ansatzfehler verursacht werden.

Arzneimittel, die nicht mit der korrekten Menge sterilen destillierten/deionisierten Wassers rekonstituiert werden, können zu falschen Ergebnissen führen.

Das gründliche Durchmischen der inokulierten Reagenzgläser ist äußerst wichtig. Wenn es versäumt wird, können Mikroorganismen fälschlich als „resistent" getestet werden.

Wenn die Röhrchen des AST-Ansatzes nicht in der richtigen Anordnung in den AST-Röhrchenständer gestellt werden, können falsche Ergebnisse erzielt werden. Wenn die falsche Arzneimitteldefinition für den jeweiligen Röhrchenständer gewählt wird, können ungültige oder falsche Ergebnisse erzielt werden.

Wenn der AST-Ansatz nicht korrekt in das Gerät eingesetzt wird, kann ein anonymer Fehlerzustand ausgelöst werden, der innerhalb von 8 Stunden behoben werden muß. Wenn der Fehlerzustand nicht innerhalb von 8 Stunden behoben wird, muß der AST-Ansatz verworfen und neu vorbereitet werden.

Wenn die SIRE-Supplement nicht im AST-Ansatz verwendet wird, können falsche Ergebnisse erzielt werden. Einem AST-Ansatz darf KEINE **BACTEC MGIT** Wachstumssupplement zugesetzt werden.

ERWARTETE WERTE

Insgesamt wurden 106 klinische Isolate von *M. tuberculosis* in vier Labors an verschiedenen geographischen Standorten mit dem **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstest geprüft. Die Tests wurden sowohl mit frischen klinischen Isolaten als auch mit Stammisolaten aus flüssigen und festen Kulturen durchgeführt. Insgesamt wurden 200 Empfindlichkeitstests (aus flüssigen und festen Medien) bei den kritischen Konzentrationen von Streptomycin (STR), Isoniazid (INH) sowie Rifampin (RIF) und in einem separaten Testansatz insgesamt 223 Empfindlichkeitstests (aus flüssigen und festen Medien) bei der kritischen Konzentration von Ethambutol durchgeführt. Die gesamtdurchschnittliche Testzeit für den **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstests betrug sieben bis acht Tage, wobei die einzelnen Testzeiten zwischen vier und vierzehn Tagen lagen. Diese Daten sind in Abbildung 1 am Ende der Packungsbeilage aufgeführt.

LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Studien

Keimdichtebereiche der AST-Inokula aus flüssigen und festen Medien:

Flüssige Medien – Das empfohlene Verfahren zur Vorbereitung eines AST-Ansatzes aus einem positiven **MGIT** 7-mL-Röhrchen schreibt die Verwendung eines direkten Inokulums an Tag 1 und Tag 2 nach dem Positivwerden und eines 1:5 verdünnten Inokulums an Tag 3 bis 5 nach dem Positivwerden vor. Interne Studien zeigten, daß Inokula, die aus einem positiven **MGIT** 7-mL-Röhrchen an Tag 1 bis Tag 5 nach dem Positivwerden entnommen wurden, zwischen 0,8 x 10^5 und 3,2 x 10^5 KBE/mL enthalten.

Feste Medien – Das empfohlene Verfahren zur Zubereitung eines AST-Ansatzes aus dem Wachstum auf einem festen Medium (bis zu 14 Tage) schreibt die Verwendung einer 1:5 verdünnten Bakteriensuspension mit einer Trübung von 0,5 McFarland vor. Interne Studien haben gezeigt, daß Inokula, die aus einem festen Kulturmedium zubereitet wurden, zwischen 1,4 x 10^5 und 2,4 x 10^6 KBE/mL enthalten.

Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Die Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge wurde anhand von fünfundzwanzig *M. tuberculosis*-Isolaten (einschließlich fünf ATCC-Stämmen) beurteilt. Jeder **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Test bei der kritischen Arzneimittelkonzentration wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt, so daß insgesamt fünfundsiebzig Ergebnisse pro Arzneimittel vorlagen. Jedes Replikat repräsentierte eine andere Testbedingung, die sich durch die Charge des verwendeten SIRE-Arzneimittels und des SIRE-Supplement (je drei Chargen) unterschieden.

Mit Ausnahme der ATCC-Stämme wurden Isolate, die beim ersten Test resistent gegenüber Streptomycin, Isoniazid oder Ethambutol waren, danach mit der hohen Arzneimittelkonzentration getestet. Zusätzlich zu den getesteten resistenten Isolaten wurden zwei STR-empfindliche (kritische Konzentration), zwei INH-empfindliche (kritische Konzentration) und zwei EMB-empfindliche (kritische Konzentration) Isolate in den Empfindlichkeitsprofiltest aufgenommen. Die erzielten Ergebnisse wurden mit den erwarteten Ergebnissen verglichen.

Die Gesamtreproduzierbarkeit für jedes Arzneimittel bei der kritischen Konzentration betrug 96 % für STR, 100 % für INH, 100 % für RIF und 100 % für EMB. Die Gesamtreproduzierbarkeit für jedes Arzneimittel bei der hohen Konzentration betrug 96 % für STR 4.0 und 100 % für INH 0.4.

Testung eines CDC-Referenzpanels:

Die Leistung des **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstests wurde anhand eines Panels von Referenzisolaten der CDC (Centers for Disease Control and Prevention, GA, USA) beurteilt. Das Panel bestand aus dreißig *M. tuberculosis*-Isolaten mit bekanntem Empfindlichkeitsmuster (unter Anwendung der Proportionsmethode bestimmt). Das Panel wurde zweimal mit dem **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstest getestet und beide Ergebnisse stimmten überein. Die Ergebnisse des **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Tests wurden mit den CDC-Referenzergebnissen verglichen.

Die Gesamtübereinstimmung mit den CDC-Referenzergebnissen für jedes Arzneimittel bei der kritischen Konzentration betrug 93 % für STR, 100 % für INH, 100 % für RIF und 100 % für EMB. Die Gesamtübereinstimmung für jedes Arzneimittel bei der hohen Konzentration betrug 100 % für STR 4.0 und 100 % für INH 0.4.

<u>Klinische Beurteilung</u>

Der **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstest wurde in vier klinischen Labors an verschiedenen geographischen Standorten beurteilt. Bei den Labors handelte es sich um regionale Referenzzentren und Labors an Universitätskliniken, einschließlich eines Labors im Ausland. Der **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstest wurde mit der Proportionsmethode[2] verglichen. Die erste Beurteilung erfolgte mit den Arzneimitteln Streptomycin, Isoniazid und Rifampin. Für das Arzneimittel Ethambutol wurde eine separate Beurteilung durchgeführt

Reproduzierbarkeitstests

Die Beurteilung der Reproduzierbarkeit des **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Tests erfolgte in den klinischen Labors mit einem Panel von zehn qualifizierten Isolaten, einschließlich mehrerer Isolate, die gegen jedes der Arzneimittel resistent waren. Die Ergebnisse des **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Tests wurden mit den erwarteten Ergebnissen verglichen. Die Gesamtreproduzierbarkeit für jedes Arzneimittel bei der kritischen Konzentration betrug 98,9 % für STR, 99,7 % für INH, 99,2 % für RIF und 97,5 % für EMB. Die Reproduzierbarkeit in den einzelnen Labors lag zwischen 89,9 % und 100 % für alle Arzneimittel bei der kritischen Konzentration. Die Gesamtreproduzierbarkeit für jedes Arzneimittel bei der hohen Konzentration betrug 99,7 % für STR 4.0 und 95,6 % für INH 0.4. Die Reproduzierbarkeit in den einzelnen Labors lag zwischen 92,2 % und 100 % für alle Arzneimittel bei der hohen Konzentration.

Testung eines CDC-Referenzpanels:

Die Leistung des **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstests wurde anhand eines Panels von Referenzisolaten der CDC (Centers for Disease Control and Prevention, GA, USA) beurteilt. Das Panel bestand aus dreißig *M. tuberculosis*-Isolaten mit bekanntem Empfindlichkeitsmuster (unter Anwendung der Proportionsmethode bestimmt), die in jedem klinischen Labor getestet wurden.

Tabelle 1 zeigt die Übereinstimmung des **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstests für jedes Arzneimittel im Vergleich mit den CDC-Referenzergebnissen.

Tabelle 1: CDC-Referenzpanel – BACTEC MGIT 960: Testung in klinischen Labors

MGIT 960	Anzahl getestet	Anzahl korrekt	% korrekt
STR 1,0	120	111	92,5
INH 0,1	120	119	99,2
RIF 1,0	120	120	100
EMB 5,0	119	111	93,3
STR 4,0	29*	29	100
INH 0,4	87*	82	94,3

* Mit dem STR 4.0 und INH 0.4 wurden nur Isolate getestet, die bei den kritischen Konzentrationen resistent waren.

Testung klinischer Isolate:

Insgesamt wurden 106 klinische Isolate von *M. tuberculosis* mit dem **BACTEC MGIT** 960 SIRE-Empfindlichkeitstest und der Proportionsmethode getestet. Dabei wurden sowohl frische klinische Isolate als auch Stammisolate aus flüssigen und festen Kulturmedien getestet. Bei der ersten Empfindlichkeitsprüfung mit Streptomycin, Isoniazid und Rifampin (kritische Konzentration) wurden insgesamt 195 Testergebnisse erzielt. Eine separate Beurteilung von Ethambutol wurde mit gefrorenen Aliquoten der ursprünglichen klinischen und Stammisolate sowie mit prospektiven klinischen Isolaten aus flüssigen und festen Kulturmedien durchgeführt. Die Testung von Ethambutol bei der kritischen Konzentration lieferte insgesamt 223 Testergebnisse.

Tabelle 2 zeigt die Testergebnisse der klinischen Isolate aus flüssigen Kulturmedien für jedes Arzneimittel (kritische Konzentration). Tabelle 3 zeigt die Testergebnisse der kli-nischen Isolate aus festen Kulturmedien für jedes Arzneimittel (kritische Konzentration).

Tabelle 2: Ergebnisse der klinischen Isolate aus flüssigen Kulturmedien – BACTEC MGIT 960 AST im Vergleich zur Proportionsmethode

	Proportionsmethode			MGIT 960 AST System				
ARZNEIMITTEL	Konzentration	E	R	Konzentration	Empfindlich Anz. Übereinstimmung	% Übereinstimmung (95% VI)	Resistent Anz. Übereinstimmung	% Übereinstimmung (95% VI)
STR	2,0 µg/mL	69	27	1,0 µg/mL	62	90 (80–96)	26	96 (81–100)
INH	0,2 µg/mL	59	37	0,1 µg/mL	57	97 (88–100)	36	97 (86–100)
RIF	1,0 µg/mL	72	24	1,0 µg/mL	71	99 (93–100)	24	100 (95–100)
EMB	5,0 µg/mL	91	20	5,0 µg/mL	88	97 (91–99)	17	85 (62–97)

Alle Isolate mit diskordanten **MGIT**-Ergebnissen wurden in zwei unabhängigen Labors anhand der Proportionsmethode getestet. Von den sieben diskordanten (R-960; E-Proportionsmethode) STR-resistenten Isolaten waren drei in beiden Labors resistent und eines war in beiden Labors empfindlich. Die restlichen drei waren in einem Labor resistent und im anderen Labor empfindlich. Das diskordante (E-960, R-Proportionsmethode) STR-empfindliche Isolat war in beiden Labors empfindlich. Die beiden diskordanten (R-960, E-Proportionsmethode) INH-resistenten Isolate waren in beiden Labors empfindlich. Das diskordante (E-960, R-Proportionsmethode) INH-empfindliche Isolat war in beiden Labors empfindlich. Das diskordante (R-960, E-Proportionsmethode) RIF-resistente Isolat war in beiden Labors resistent. Die drei diskordanten (R-960, E-Proportionsmethode) EMB-resistenten Isolate waren in beiden Labors empfindlich. Von den drei diskordanten (E-960; R-Proportionsmethode) EMB-resistenten Isolaten waren zwei in beiden Labors empfindlich und eines war im einen Labor resistent und im anderen empfindlich.

Tabelle 3: Ergebnisse der klinischen Isolate aus festen Kulturmedien – BACTEC MGIT 960 AST im Vergleich zur Proportionsmethode

	Proportionsmethode			MGIT 960 AST System				
ARZ-NEI-MITTEL	Konzen-tration	E	R	Konzen-tration	Empfindlich Anz. Überein-stimmung	% Übereinstim-mung (95% VI)	Resistent Anz. Überein-stimmung	% Übereinstim-mung (95% VI)
STR	2,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	65*	93 (84–98)	28	97 (82–100)
INH	0,2 µg/mL	63	36	0,1 µg/mL	62	98 (92–100)	35	97 (86–100)
RIF	1,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	70	100 (95–100)	26	90 (73–98)
EMB	5,0 µg/mL	87	25	5,0 µg/mL	86	99 (94–100)	20	80 (59–93)

Alle Isolate mit diskordanten **MGIT**-Ergebnissen wurden in zwei unabhängigen Labors anhand der Proportionsmethode getestet. Von den fünf diskordanten (R-960; E-Proportionsmethode) STR-resistenten Isolaten waren zwei in beiden Labors resistent und eines war in beiden Labors empfindlich. Die restlichen zwei waren in einem Labor resistent und im anderen Labor empfindlich. Das diskordante (E-960, R-Proportionsmethode) STR-empfindliche Isolat war in beiden Labors resistent. Das diskordante (R-960, E-Proportionsmethode) INH-resistente Isolat war in beiden Labors empfindlich. Das diskordante (E-960, R-Proportionsmethode) INH-empfindliche Isolat war in beiden Labors resistent. Die drei diskordanten (E-960, R-Proportionsmethode) RIF-empfindlichen Isolate waren in beiden Labors empfindlich. Das diskordante (R-960, E-Proportionsmethode) EMB-resistente Isolat war in beiden Labors resistent. Von den fünf diskordanten (E-960, R-Proportionsmethode) EMB-empfindlichen Isolaten waren vier in beiden Labors empfindlich. Das andere Isolat war in einem Labor resistent und im anderen Labor empfindlich.

Tabelle 4 zeigt die Testergebnisse der klinischen Isolate aus flüssigen Kulturmedien für Streptomycin und Isoniazid (hohe Konzentration). Tabelle 5 zeigt die Testergebnisse der klinischen Isolate aus festen Kulturmedien für Streptomycin und Isoniazid (hohe Konzentration).

Tabelle 4: Ergebnisse der klinischen Isolate aus flüssigen Kulturmedien – BACTEC MGIT 960 AST im Vergleich zur Proportionsmethode

	Proportionsmethode			MGIT 960 AST System				
ARZ-NEI-MITTEL	Konzen-tration	E	R	Konzen-tration	Empfindlich Anz. Überein-stimmung	% Übereinstim-mung (95% VI)	Resistent Anz. Überein-stimmung	% Übereinstim-mung (95% VI)
STR	10,0 µg/mL	77	19	4,0 µg/mL	73*	95 (87–99)	17	90 (67–99)
INH	1,0 µg/mL	65	31	0,4 µg/mL	65*	100 (95–100)	29	94 (79–99)

* Setzt voraus, daß alle Isolate, die im **MGIT** bei der kritischen Konzentration empfindlich sind, im **MGIT** bei der hohen Konzentration ebenfalls empfindlich sind.

Alle Isolate mit diskordanten **MGIT**-Ergebnissen wurden in zwei unabhängigen Labors anhand der Proportionsmethode getestet. Die vier diskordanten (R-960, E-Proportionsmethode) STR-resistenten Isolate waren in beiden Labors empfindlich. Von den zwei diskordanten (E-960, R-Proportionsmethode) STR-empfindlichen Isolaten war eines in beiden Labors empfindlich und eines war in beiden Labors resistent. Von den zwei diskordanten (E-960, R-Proportionsmethode) INH-empfindlichen Isolaten war eines in beiden Labors empfindlich und eines war in beiden Labors resistent.

Tabelle 5: Ergebnisse der klinischen Isolate aus festen Kulturmedien – BACTEC MGIT 960 AST im Vergleich zur Proportionsmethode

	Proportionsmethode			MGIT 960 AST System				
ARZ-NEI-MITTEL	Konzen-tration	E	R	Konzen-tration	Empfindlich Anz. Überein-stimmung	% Übereinstim-mung (95% VI)	Resistent Anz. Überein-stimmung	% Übereinstim-mung (95% VI)
STR	10,0 µg/mL	78	21	4,0 µg/mL	73*	94 (86–98)	17	81 (58–95)
INH	1,0 µg/mL	68	31	0,4 µg/mL	68*	100 (95–100)	30	97 (83–100)

* Setzt voraus, daß alle Isolate, die im **MGIT** bei der kritischen Konzentration empfindlich sind, im **MGIT** bei der hohen Konzentration ebenfalls empfindlich sind.

Alle Isolate mit diskordanten **MGIT**-Ergebnissen wurden in zwei unabhängigen Labors anhand der Proportionsmethode getestet. Die fünf diskordanten (R-960,

E-Proportionsmethode) STR-resistenten Isolate waren in beiden Labors empfindlich. Von den vier diskordanten (E-960, R-Proportionsmethode) STR-empfindlichen Isolaten waren drei in beiden Labors empfindlich und eines war in beiden Labors resistent. Das diskordante (E-960, R-Proportionsmethode) INH-empfindliche Isolat war in beiden Labors resistent.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung
245123	**BACTEC MGIT** 960 SIRE-Testkit, Karton mit 4 Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und 8 Fläschchen SIRE-Supplement.
245125	**BACTEC MGIT** 960 STR 4.0-Testkit, Karton mit 1 Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und 2 Fläschchen SIRE-Supplement.
245157	**BACTEC MGIT** 960 IR Testkit, Karton mit 2 Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und 4 Fläschchen SIRE-Supplement.
245126	**BACTEC MGIT** 960 INH 0.4-Testkit, Karton mit 1 Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und 2 Fläschchen SIRE-Supplement.

LITERATUR: Siehe den Abschnitt „References" im englischen Text.

BD Kit BACTEC MGIT 960 SIRE
Per il test di sensibilità antimicobatterica di *Mycobacterium tuberculosis*

Italiano

USO PREVISTO

Il kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE è una procedura qualitativa rapida per analizzare la sensibilità di *Mycobacterium tuberculosis* da coltura a streptomicina (STR), isoniazide (INH), rifampicina (RIF) e etambutolo (EMB). Il kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 Kit e il kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 trovano impiego per il test a concentrazioni più elevate di farmaco.

I kit per test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 vengono usati con i sistemi **BACTEC MGIT** 960 e **BACTEC MGIT** 320.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL METODO

Il test di sensibilità antimicobatterica è importante per stabilire la terapia corretta dei pazienti affetti da tubercolosi. La terapia della tubercolosi si basa generalmente su un regime a più farmaci a base di antimicobatterici come streptomicina, isoniazide, rifampicina e etambutolo. È importante che i farmaci antimicobatterici prescritti manifestino attività specifica contro *Mycobacterium tuberculosis*, ossia che il ceppo isolato sia sensibile al farmaco.

L'incidenza di ceppi multiresistenti di *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) è diventata recentemente un serio problema di sanità pubblica.[1] La possibile resistenza a uno dei quattro farmaci primari, streptomicina (STR), isoniazide (INH), rifampicina (RIF) ed etambutolo (EMB), rende la malattia ancora più difficile e costosa da curare; pertanto la rilevazione rapida di questi ceppi è essenziale ai fini di un trattamento efficace dei pazienti.

I metodi più comunemente usati per il test di sensibilità agli agenti antimicobatterici sono due. Il primo, conosciuto come metodo delle proporzioni,[2] utilizza Agar Middlebrook e Cohn 7H10 e confronta i conteggi delle colonie presenti su terreni contenenti e su terreni senza farmaci. La resistenza ad un farmaco viene rilevata quando l'1% o più della popolazione batterica risulta resistente alla concentrazione del farmaco testato. In genere i risultati si ottengono dopo 21 giorni di incubazione. Il secondo metodo, noto come metodo della sensibilità radiometrica **BACTEC** 460TB,[3] richiede generalmente da 4 a 12 giorni ed è basato sulla produzione di anidride carbonica radioattiva marcata con ^{14}C da parte dei micobatteri in crescita. Tale produzione è evidenziata da un aumento dell'indice di crescita nel sistema.

Tradizionalmente, il metodo delle proporzioni prevedeva l'impiego di due concentrazioni di antibiotici per il test di sensibilità di *Mycobacterium tuberculosis*. Il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, già NCCLS) consiglia tuttora di impiegare, nella procedura di analisi con il metodo delle proporzioni, due concentrazioni di farmaci primari, eccetto la rifampicina. Le concentrazioni basse consigliate per la procedura con il metodo delle proporzioni corrispondono alle concentrazioni critiche per tali farmaci. Si definisce come critica la concentrazione di farmaco che permette di interpretare un risultato come indicativo di resistenza o di sensibilità. Un isolato viene considerato resistente quando l'1% o più della popolazione batterica analizzata cresce in presenza della concentrazione critica del farmaco. La concentrazione elevata di farmaco viene usata per definire il grado di resistenza

all'interno della popolazione testata. Questo risultato fornisce al medico informazioni utili per stabilire la necessità o meno di modificare il regime terapeutico.

Il test **BACTEC MGIT** 960 SIRE consente di ottenere il risultato della sensibilità quasi nello stesso arco di tempo del sistema **BACTEC** 460TB. Inoltre, questo metodo non è radiometrico e consente generalmente di ottenere risultati di sensibilità appropriati più rapidamente rispetto alla procedura con il metodo delle proporzioni.

Al fine di evitare l'incidenza di falsa sensibilità, il test **BACTEC MGIT** 960 SIRE è stato sviluppato con concentrazioni critiche di streptomicina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo leggermente inferiori rispetto alle concentrazioni critiche usate nel metodo delle proporzioni. Questo è particolarmente evidente nel caso della streptomicina, dove molti isolati si avvicinano alla concentrazione critica consigliata per le procedure con il metodo delle proporzioni. Per questo motivo, per la streptomicina e l'isoniazide è stata sviluppata una seconda concentrazione più elevata di farmaco. È così possibile riportare un risultato di sensibilità alla concentrazione critica senza dover ricorrere ad altre analisi. Gli isolati resistenti alla concentrazione critica di streptomicina, isoniazide e/o etambutolo, devono essere analizzati ad una concentrazione più elevata di farmaco usando il sistema **BACTEC MGIT** o un metodo alternativo. In questo caso, il risultato finale di resistenza alla concentrazione critica può essere riportato, indicando che è in corso anche il test ad una concentrazione più elevata.

Per individuare gli isolati che esibiscono una resistenza di basso livello, vale a dire che sono resistenti alla concentrazione critica e sensibili alla concentrazione elevata, è importante analizzare gli isolati resistenti ad una concentrazione più elevata. Le concentrazioni elevate nel sistema **BACTEC MGIT** sono state calibrate per essere inferiori alle concentrazioni usate nel metodo delle proporzioni. Il sistema **BACTEC MGIT** è predisposto in modo tale che un risultato di resistenza, specialmente per la streptomicina, può talvolta non essere correlato ad un risultato di resistenza alla concentrazione elevata nel metodo delle proporzioni. Nel caso si ottenga un risultato di resistenza alla streptomicina a concentrazione elevata, occorre eseguire un'analisi alla stessa concentrazione con un metodo alternativo.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La provetta di indicatore di crescita dei micobatteri **BBL MGIT** da 7 mL contiene un brodo Middlebrook 7H9 modificato che favorisce la crescita e l'individuazione dei micobatteri (vedere il foglio illustrativo incluso nella confezione di **BBL MGIT** da 7 mL). La provetta **MGIT** contiene un composto fluorescente fissato in silicone sul fondo di una provetta a base circolare da 16 x 100 mm. Il composto fluorescente è sensibile all'ossigeno dissolto nel brodo. La concentrazione iniziale di ossigeno dissolto attenua l'emissione dal composto e limita l'intensità della fluorescenza rilevabile. Successivamente, i microrganismi in crescita attiva consumano l'ossigeno permettendo così una maggiore fluorescenza del composto.

Il kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE è un test qualitativo di 4 – 13 giorni. Il test è basato sul confronto tra la crescita di un isolato di *M. tuberculosis* in una provetta contenente farmaco e in una provetta senza farmaco (Controllo di crescita). Lo strumento **BACTEC MGIT** controlla l'aumento della fluorescenza nelle provette. Per determinare i risultati di sensibilità, lo strumento rileva la fluorescenza nella provetta con il farmaco e la confronta con fluorescenza nella provetta del Controllo di crescita.

Lo strumento **BACTEC MGIT** interpreta automaticamente i risultati ottenuti e riporta un risultato di sensibilità o di resistenza.

REAGENTI

Il kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE contiene un flacone di polvere liofilizzata di streptomicina, uno di isoniazide, uno di rifampicina ed uno di etambutolo e otto flaconi di supplemento SIRE.

Formula approssimata* per flacone di farmaco liofilizzato: Streptomicina .... 332 µg

Formula approssimata* per flacone di farmaco liofilizzato: Isoniazide .... 33,2 µg

Formula approssimata* per flacone di farmaco liofilizzato: Rifampicina (RIF) . 332 µg

Formula approssimata* per flacone di farmaco liofilizzato: Etambutolo .... 1660 µg

Il kit **BACTEC MGIT** 960 IR contiene un flacone di isoniazide e uno di rifampicina liofilizzate, e quattro flaconi di supplemento SIRE.

Formula approssimata* per flacone di farmaco liofilizzato: Isoniazide .... 33,2 µg

Formula approssimata* per flacone di farmaco liofilizzato: Rifampicina .... 332 µg

Il kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 contiene un flacone di polvere liofilizzata di streptomicina e due flaconi di supplemento SIRE.

Formula approssimata* per flacone di farmaco liofilizzato: Streptomicina ...... 664 µg

Il kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 contiene un flacone di polvere liofilizzata di isoniazide e due flaconi di supplemento SIRE.

Formula approssimata* per flacone di farmaco liofilizzato: Isoniazide .... 66,4 µg

Il supplemento **BACTEC MGIT** 960 SIRE contiene 20 mL di terreno di arricchimento OADC Middlebrook.

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Albumina bovina ....50,0 g Catalasi......................0,03 g
Destrosio.............................20,0 g Acido oleico ....0,6 g

**Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.*

Conservazione e ricostituzione dei reagenti – Flaconi di farmaci **BACTEC MGIT** 960 SIRE – Alla consegna, conservare i flaconi dei farmaci liofilizzati a 2 – 8 °C. Una volta ricostituite, le soluzioni di antibiotico possono essere congelate e conservate a temperature di -20 °C o inferiori per un massimo di sei mesi, ma non oltre la data di scadenza originaria. Una volta scongelate le soluzioni, usarle immediatamente. Eliminare le aliquote non utilizzate.

Supplemento **BACTEC MGIT** SIRE – Alla consegna, conservare il prodotto al buio a 2 – 8° C. Non congelare o riscaldare eccessivamente. Aprire ed usare prima della data di scadenza. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce.

Istruzioni per l'uso

Ricostituire ogni flacone di polvere liofilizzata di streptomicina del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con **4 mL** di acqua distillata/deionizzata sterile, per ottenere una soluzione stock di 83 µg/mL.

Ricostituire ogni flacone di polvere liofilizzata di isoniazide del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con **4 mL** di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 8,3 µg/mL.

Ricostituire ogni flacone di polvere liofilizzata di rifampicina del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con **4 mL** di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 83 µg/mL.

Ricostituire ogni flacone di polvere liofilizzata di etambutolo del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con **4 mL** di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 415 µg/mL.

N.B. I seguenti flaconi vengono ricostituiti con un volume diverso. Il mancato impiego del volume appropriato di acqua distillata sterile per ricostituire le concentrazioni più elevate di farmaco invalida i risultati delle analisi.

Ricostituire ogni flacone di polvere liofilizzata di streptomicina del kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 con **2 mL** di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 332 µg/mL.

Ricostituire ogni flacone di polvere liofilizzata di isoniazide del kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 con **2 mL** di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 33,2 µg/mL.

Avvertenze e precauzioni:

Per uso diagnostico *in vitro.*

CAMPIONI DI ANALISI POTENZIALMENTE INFETTI – I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e il virus dell'immunodeficienza umana. Nel maneggiare qualsiasi oggetto contaminato con sangue o altri liquidi biologici, occorre attenersi alle direttive del presidio locale e alle "precauzioni standard".[4-7]

Quando si lavora con una coltura in crescita di *M. tuberculosis*, è necessario attenersi alle procedure di sicurezza biologica (BSL) di livello 3 e disporre di attrezzature e recipienti conformi alle misure di contenimento.

Leggere e seguire le istruzioni contenute nei fogli illustrativi contenuti nelle rispettive confezioni, compreso quello della provetta di indicatore di crescita dei micobatteri **BBL MGIT** da 7 mL.

Prima dell'uso, esaminare le provette e i flaconi per accertarsi che non siano contaminati o danneggiati. Eliminare le provette e i flaconi che risultano non idonei. Esaminare con attenzione le provette cadute ed eliminarle se risultano danneggiate.

In caso di rottura di una provetta: 1) chiudere i cassetti dello strumento; 2) spegnere lo strumento; 3) sgombrare immediatamente la zona; 4) consultare i regolamenti del laboratorio utilizzato o dei CDC (Centers for Disease Control). Una provetta inoculata rotta o che perde può produrre un aerosol di micobatteri e pertanto deve essere trattata in modo opportuno.

Prima di eliminare tutte le provette **MGIT** inoculate, sterilizzarle in autoclave.

PREPARAZIONE DELL'INOCULO

Le modalità di preparazione illustrate qui di seguito si riferiscono a colture pure di *M. tuberculosis*. Il laboratorio deve confermare, mediante tecniche di identificazione appropriate, che l'isolato da testare è una coltura pura di *M. tuberculosis*.

L'inoculo può essere preparato a partire da terreno solido o da una provetta **BACTEC MGIT** 7 mL. Le colture cresciute su terreno liquido e solido possono anche essere utilizzate per preparare una provetta **MGIT** di semina, a sua volta usata per preparare l'inoculo. Ognuna di queste opzioni è descritta qui di seguito.

Preparazione dell'inoculo da terreno solido:

N.B. Al fine di ottenere la concentrazione appropriata di organismi per il test di sensibilità, è importante preparare l'inoculo in osservanza delle seguenti istruzioni.

1. Aggiungere 4 mL di brodo **BBL** Middlebrook 7H9 (o brodo **BBL MGIT**) in una provetta sterile da 16,5 x 128 mm munita di tappo e contenente 8 – 10 microsfere di vetro.
2. Con un'ansa sterile, prelevare quante più colonie possibile da una crescita di non oltre 14 giorni, cercando di non rimuovere terreno solido. Sospendere le colonie nel brodo Middlebrook 7H9.
3. Agitare con vortex per 2 – 3 min la sospensione per frammentare i grumi più grossi. La torbidità della sospensione deve essere superiore allo standard 1,0 McFarland.
4. Lasciar riposare la sospensione per 20 min senza disturbarla.
5. Trasferire il supernatante in un'altra provetta sterile da 16,5 x 128 mm con tappo (evitare di trasferire il sedimento) e lasciar riposare per altri 15 min.
6. Trasferire il supernatante (dovrebbe essere omogeneo e privo di grumi) in una terza provetta sterile da 16,5 x 128 mm. N.B. Durante questo passaggio, la torbidità della sospensione di organismi deve essere superiore allo standard 0,5 McFarland.
7. Regolare la torbidità della sospensione sullo standard 0,5 McFarland confrontandola visivamente con lo stesso standard. Non regolare ad una torbidità inferiore allo standard 0,5 McFarland.
8. Diluire 1 mL della sospensione così regolata in 4 mL di soluzione fisiologica sterile (diluizione 1:5). Passare alla "Procedura di inoculo per il test di sensibilità".

Preparazione dell'inoculo da una provetta BACTEC MGIT 7 mL positiva

N.B. Al fine di ottenere la concentrazione appropriata di organismi per il test di sensibilità, è importante preparare l'inoculo secondo i tempi indicati qui di seguito.

1. Viene considerato Giorno 0 il primo giorno in cui si ottiene sullo strumento una provetta **MGIT** positiva.
2. Per la preparazione dell'inoculo da testare, usare una provetta positiva **MGIT** da 7 mL a partire dal giorno **successivo** alla comparsa di positività (Giorno 1) sullo strumento **BACTEC MGIT** fino al quinto giorno compreso di positività (Giorno 5). Una provetta positiva da oltre cinque giorni deve essere sottoposta a subcoltura in una nuova provetta **MGIT** da 7 mL contenente il supplemento di crescita **BACTEC MGIT**, testata sullo strumento **BACTEC MGIT** fino alla comparsa di positività e quindi usata tra il primo e il quinto giorno dalla positività. Vedere "Preparazione di una provetta **MGIT** di semina a partire da terreno liquido".
3. Se la provetta è nel Giorno 1 o Giorno 2 di positività, usare la sospensione di brodo **MGIT** per le procedure di inoculo. Mescolare accuratamente. Passare alla "Procedura di inoculo per il test di sensibilità".
4. Se la provetta è nel Giorno 3, Giorno 4 o Giorno 5 di positività, mescolare accuratamente e diluire 1 mL di brodo positivo in 4 mL di soluzione fisiologica sterile (diluizione 1:5). Mescolare accuratamente. Usare la sospensione diluita per le procedure di inoculo. Passare alla "Procedura di inoculo per il test di sensibilità".

Preparazione di una provetta MGIT di semina a partire da terreno liquido

1. Miscelare capovolgendo o vortexando la provetta.
2. Fare una diluizione 1:100 aggiungendo 0,1 mL di coltura a 10 mL di Brodo **BBL** Middlebrook 7H9 o Brodo **BBL MGIT**. Mescolare accuratamente.
3. Aggiungere 0,5 mL della sospensione ottenuta in una provetta **MGIT** 7 mL addizionata di 0,8 mL di supplemento di crescita **BACTEC MGIT**.
4. Tappare ermeticamente e miscelare accuratamente capovolgendo la provetta 2 – 3 volte.
5. Introdurre la provetta nello strumento **BACTEC MGIT** e analizzare fino al raggiungimento della positività.

NOTA: La durata fino a positività deve essere di ≥ 4 giorni ai fini del test AST. Se la provetta raggiunge la positività in < 4 giorni, ritornare al punto 1 e preparare una nuova provetta di semina.

6. Dal momento di positività, la provetta può essere usata entro uno - cinque giorni. Procedere a "Preparazione dell'inoculo da una provetta **BACTEC MGIT** 7 mL positiva" (sopra).

Preparazione di una provetta MGIT di semina a partire da terreno solido

1. Con un'ansa sterile, rimuovere la crescita da uno slant e aggiungerla in una provetta **MGIT** 7 mL addizionata di 0,8 mL di supplemento di crescita **BACTEC MGIT**.
2. Tappare ermeticamente e miscelare accuratamente capovolgendo la provetta 2 – 3 volte.
3. Introdurre la provetta nello strumento **BACTEC MGIT** e testare fino al raggiungimento della positività.

   NOTA: La durata fino a positività **deve** essere di ≥ 4 giorni ai fini del test AST. Se la provetta raggiunge la positività in < 4 giorni, ritornare al punto 1 e preparare una nuova provetta di semina.
4. Dal momento di positività, la provetta può essere usata entro uno - cinque giorni. Procedere a "Preparazione dell'inoculo da una provetta **BACTEC MGIT** 7 mL positiva" (sopra).

PROCEDURA

Materiale fornito – Kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE contenente un flacone di ciascun farmaco liofilizzato e otto flaconi di supplemento SIRE (circa 40 test per farmaco in ciascun kit). Kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 contenente un flacone di ciascun farmaco liofilizzato e due flaconi di supplemento SIRE (circa 20 test per kit) e Kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 contenente un flacone di ciascun farmaco liofilizzato e due flaconi di supplemento SIRE (circa 20 test per kit).

Materiali richiesti ma non forniti – Provette di indicatore di crescita dei micobatteri **BBL MGIT** da 7 mL, terreni di coltura ausiliari, reagenti, organismi per il controllo di qualità e attrezzatura di laboratorio necessaria per questa procedura.

Procedura di inoculo per il test di sensibilità con il kit BACTEC MGIT 960 SIRE

1. Etichettare cinque provette **MGIT** da 7 mL per ogni isolato da testare. Contrassegnarne una come GC (= Growth Control o Controllo di crescita), una come STR, una come INH, una come RIF e una come EMB. Disporre le provette secondo la sequenza corretta nel carrello per set AST di dimensioni appropriate (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**).
2. In ogni provetta, dispensare in asepsi 0,8 mL di supplemento **BACTEC MGIT** SIRE. N.B. È importante usare il supplemento fornito con il kit.
3. Con una micropipetta, dispensare in asepsi 100 µL di soluzione **MGIT** STR da 83 µg/mL nella provetta **MGIT** che riporta l'etichetta appropriata. Con una micropipetta, dispensare in asepsi 100 µL di soluzione **MGIT** INH da 8,3 µg/mL nella provetta **MGIT** che riporta l'etichetta appropriata. Con una micropipetta, dispensare in asepsi 100 µL di soluzione **MGIT** RIF da 83 µg/mL nella provetta **MGIT** che riporta l'etichetta appropriata. Con una micropipetta, dispensare in asepsi 100 µL di soluzione **MGIT** EMB da 415 µg/mL nella provetta **MGIT** che riporta l'etichetta appropriata. È importante dispensare il farmaco corretto nella provetta corrispondente. Nella provetta **MGIT** GC non vanno aggiunti antibiotici.

Farmaco	Concentrazione del farmaco dopo la ricostituzione*	Volume dispensato nelle provette MGIT per il test	Concentrazione finale nelle provette MGIT
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1 µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0 µg/mL

* Per ottenere le concentrazioni indicate, ricostituire i farmaci con **4 mL** di acqua sterile/deionizzata.

4. **Preparazione ed inoculo della provetta del Controllo di crescita –** Per preparare la sospensione 1:100 del Controllo di crescita, pipettare in asepsi 0,1 mL di sospensione di batteri (vedi "**PREPARAZIONE DELL'INOCULO**") in 10 mL di soluzione fisiologica sterile. Mescolare accuratamente la sospensione del Controllo di crescita. Inoculare **0,5** mL della sospensione 1:100 del Controllo di crescita in una provetta **MGIT** con etichetta "GC".

5. **Inoculo delle provette contenenti farmaco –** Pipettare in asepsi 0,5 mL di sospensione di batteri (vedi "**PREPARAZIONE DELL'INOCULO**") in ognuna delle altre QUATTRO provette di farmaci (STR, INH, RIF, EMB).
6. Chiudere bene le provette con il tappo. Mescolare accuratamente capovolgendo con attenzione le provette tre o quattro volte.
7. Introdurre il set AST nello strumento **BACTEC MGIT** usando la funzione di ingresso del set AST (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**). Accertarsi che la disposizione delle provette nel carrello per il set AST sia conforme alle definizioni del carrello selezionate all'attivazione della funzione di ingresso del set AST.
8. Seminare 0,1 mL di sospensione di batteri su una piastra di agar soia **Trypticase** con 5% di sangue di montone (TSA II). Inserire in una busta di plastica e incubare a 35 – 37 °C.
9. Controllare la piastra di agar sangue dopo 48 h per verificare l'eventuale presenza di contaminazione batterica. Se non si nota alcuna crescita sulla piastra, continuare il test AST. Se si notano segni di crescita sulla piastra, eliminare il set AST (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**) e ripetere il test con una coltura pura.

Procedura di inoculo per il test di sensibilità con i kit BACTEC MGIT 960 STR 4.0 e INH 0.4

In caso di resistenza alla concentrazione critica, si raccomanda di eseguire un test del profilo di sensibilità per valutare, come minimo, la concentrazione elevata del farmaco al quale l'isolato era risultato originariamente resistente.

Provenienza dell'isolato – L'isolato usato per questo test deve essere preparato come descritto in "**PREPARAZIONE DELL'INOCULO**". Per preparare una provetta di semina dalla provetta senza farmaco del Controllo di crescita proveniente dal set AST dell'isolato precedentemente analizzato, è possibile inoculare 0,5 mL di questo isolato in una nuova provetta **MGIT** da 7 mL contenente il supplemento di crescita **BACTEC MGIT**. Non appena la provetta di semina diventa positiva, procedere come descritto in "**PREPARAZIONE DELL'INOCULO:** Preparazione da una provetta positiva MGIT".

1. Etichettare un numero sufficiente di provette **MGIT** da 7 mL in modo che per l'isolato da testare sia disponibile una provetta **MGIT** GC (Controllo di crescita) e una provetta **MGIT** di farmaco per ogni antibiotico da analizzare. Disporre le provette secondo la sequenza corretta nel carrello per set AST di dimensioni appropriate (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**).
2. In ogni provetta, dispensare in asepsi 0,8 mL di supplemento **BACTEC MGIT** SIRE. N.B. È importante usare il supplemento fornito con il kit.
3. Con una micropipetta, dispensare in asepsi 100 µL della soluzione di farmaco nella provetta **MGIT** con l'etichetta appropriata. È importante dispensare il farmaco corretto nella provetta corrispondente. Nella provetta **MGIT** GC non vanno aggiunti antibiotici.

Farmaco	Concentrazione del farmaco dopo la ricostituzione*	Volume dispensato nelle provette MGIT per il test	Concentrazione finale nelle provette MGIT
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4,0 µg/mL
MGIT INH 0.4	33,2 µg/mL	100 µL	0,4 µg/mL

* Per ottenere le concentrazioni indicate, ricostituire i farmaci con **2 mL** di acqua sterile/deionizzata.

4. **Preparazione e inoculo della provetta del Controllo di crescita –** Per preparare la sospensione 1:100 del Controllo di crescita, pipettare in asepsi 0,1 mL di sospensione di batteri (vedi "**PREPARAZIONE DELL'INOCULO**") in 10 mL di soluzione fisiologica sterile. Mescolare accuratamente la sospensione di Controllo di crescita. Inoculare **0,5 mL** della sospensione 1:100 di Controllo di crescita in una provetta **MGIT** con etichetta "GC".
5. **Inoculo delle provette contenenti farmaco** – Pipettare in asepsi 0,5 mL di sospensione di batteri (vedi "**PREPARAZIONE DELL'INOCULO**") in ognuna delle provette con farmaco.
6. Chiudere bene le provette con il tappo. Mescolare accuratamente capovolgendo con attenzione le provette tre o quattro volte.
7. Introdurre il set AST nello strumento **BACTEC MGIT** usando la funzione di ingresso del set AST (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**). Accertarsi che la disposizione delle provette nel carrello per il set AST sia conforme alle definizioni del carrello selezionate all'attivazione della funzione di ingresso del set AST.
8. Seminare 0,1 mL di sospensione di batteri su una piastra di agar soia **Trypticase** con 5% di sangue di montone (TSA II). Inserire in una busta di plastica e incubare a 35 – 37 °C.

9. Controllare la piastra di agar sangue dopo 48 h per verificare l'eventuale presenza di contaminazione batterica. Se non si nota alcuna crescita sulla piastra, continuare il test AST. Se si notano segni di crescita sulla piastra, eliminare il set AST (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**) e ripetere il test con una coltura pura.

N.B. Il test di sensibilità può essere configurato in diversi modi. È possibile, ad esempio, configurare nel sistema un set con carrello a cinque provette che contenga solo concentrazioni critiche. A seconda di test opzionali di profilo, è possibile configurare diversi altri set di carrelli per provette (vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**).

Controllo di qualità a cura dell'utente – Per ogni nuova partita o nuovo numero di lotto di flaconi del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE, si raccomanda di testare l'organismo di controllo indicato di seguito. L'organismo di controllo deve provenire da una coltura pura preparata secondo le istruzioni contenute in "**PREPARAZIONE DELL'INOCULO**".

Il set AST per il controllo di qualità (CQ) deve essere preparato in osservanza delle istruzioni contenute in "Procedura di inoculo per il test di sensibilità", relative ai kit di farmaci da analizzare. Durante la preparazione del set AST di CQ, è importante accertare la corretta ricostituzione dei farmaci liofilizzati e la corretta diluizione dell'organismo di controllo di qualità sia per il Controllo di crescita che per le provette di farmaco.

È importante dispensare il farmaco appropriato nella provetta con etichetta corrispondente. L'impiego di organismi a sensibilità estesa per il controllo di qualità non permetterà di rilevare l'introduzione di un farmaco sbagliato nelle provette del set AST.

Se entro 4 – 13 giorni si ottengono risultati conformi a quelli della tabella seguente, il kit per test **BACTEC MGIT** 960 SIRE è pronto per il test degli isolati di pazienti. Se non si ottengono i risultati appropriati, ripetere il test. Se, pur ripetendo il test, non si ottengono i risultati appropriati, non usare il prodotto prima di aver contattato il rappresentante locale di BD.

Ceppi	**GC**	**MGIT STR**	**MGIT INH**	**MGIT RIF**	**MGIT EMB**
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensibile	Sensibile	Sensibile	Sensibile

Ceppi	**GC**	**MGIT STR 4.0**	**MGIT INH 0.4**
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensibile	Sensibile

Lo stesso organismo di controllo deve essere testato per il controllo di qualità in batch una volta alla settimana, quando si esegue il test di sensibilità. Se il controllo di qualità in batch fallisce, non riportare i risultati per il farmaco (o i farmaci) che ha fallito il test per il periodo considerato. Ripetere il controllo di qualità per il farmaco (o i farmaci) e per gli isolati di pazienti associati al fallimento iniziale del controllo di qualità. Se la replica del controllo di qualità non fornisce i risultati attesi, non riportare i risultati dei pazienti. Non usare il prodotto prima di aver contattato il rappresentante locale di BD.

Le cause più comuni di fallimento del controllo di qualità evidenziate durante la valutazione esterna dei kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE sono state: la contaminazione delle colture di controllo di qualità, l'inoculo eccessivo o insufficiente dei set AST, la mancata distribuzione dei farmaci nelle provette appropriate e le condizioni di errore dello strumento.

RISULTATI

Lo strumento **BACTEC MGIT** esegue il monitoraggio dei set AST fino a quando viene determinata la sensibilità o la resistenza. Una volta completato il test del set, lo strumento **BACTEC MGIT** riporta i risultati. (Vedi il Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**). In presenza di condizioni che potrebbero influire sui risultati del test, lo strumento **BACTEC MGIT** riporterà il risultato del set AST come Errore (X), nessuna interpretazione di sensibilità. Le condizioni che possono dar luogo ad un risultato di Errore (X) sono descritte nel Manuale d'uso dello strumento **BACTEC MGIT**, Sezione 7 – Risoluzione dei problemi.

Nel riportare i risultati, è importante includere il metodo di analisi, il nome e la concentrazione del farmaco, e se il risultato è stato ottenuto usando il sistema **BACTEC MGIT** o un metodo alternativo. Per quanto riguarda il regime terapeutico appropriato e le dosi, occorre consultare uno specialista di malattie polmonari e/o infettive esperto di tubercolosi.

Nel caso di risultati imprevisti di resistenza, verificare che l'identificazione dell'isolato testato corrisponda a *M. tuberculosis* e assicurarsi che sia stata usata solamente una coltura pura (escludere la presenza di micobatteri misti, ecc.). La monoresistenza all'etambutolo è rara e deve essere verificata.[2,8]

Sommario dei risultati di BACTEC MGIT 960 SIRE alla concentrazione critica

Farmaco (concentrazione)	Risultati sistema MGIT	Referto consigliato	Intervento
STR (1,0 µg/mL) INH (0,1 µg/mL) RIF (1,0 µg/mL) EMB (5,0 µg/mL)	Sensibile (SIRE)	L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** [farmaco/concentrazione] ed è risultato sensibile.	Nessun intervento
	Resistente (SIR)	L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** [farmaco/concentrazione] ed è risultato resistente. Seguono i risultati del test [farmaco] ad una concentrazione più elevata (se eseguito).	Si raccomanda di effettuare il test ad una concentrazione più elevata (STR e/o INH).
	Resistente (E)	<u>Resistenza a più farmaci, non solo all'etambutolo (EMB)</u> L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** [Etambutolo 5,0 µg/mL] ed è risultato resistente. Consultare il laboratorio per eseguire un test con EMB ad una concentrazione più elevata.	Si raccomanda di effettuare il test con EMB ad una concentrazione più elevata, usando un metodo alternativo.
		<u>Monoresistenza all'etambutolo (EMB)</u> L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** [Etambutolo 5,0 µg/mL]ed è risultato resistente. La monoresistenza all'etambutolo è rara. Consultare il laboratorio per ottenere una conferma.	Si raccomanda di effettuare il test con EMB sia ad una concentrazione clinica che ad una concentrazione più elevata usando un metodo alternativo.
	Errore (X)	Nessun referto.	Ripetere il test

Sommario dei risultati BACTEC MGIT 960 STR 4.0 e INH 0.4

Farmaco (concentrazione)	Risultati sistema MGIT	Referto consigliato	Intervento
STR (4,0 µg/mL)	Sensibile	L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** (streptomicina da 4,0 µg/mL) ed è risultato sensibile. L'isolato, risultato resistente a 1,0 µg/mL e sensibile a 4,0 µg/mL, indica un basso livello di resistenza alla streptomicina.	Nessun intervento
	Resistente	L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** (streptomicina da 4,0 µg/mL) ed è risultato resistente. Consultare il laboratorio per ottenere una conferma.	Per verificare il risultato, l'isolato deve essere testato con un metodo alternativo.
	Errore(X)	Nessun referto.	Ripetere il testo.
INH (0,4 µg/mL)	Sensibile	L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** (isoniazide 0,4 µg/mL) ed è risultato sensibile. L'isolato, risultato resistente a 0,1 µg/mL e sensibile a 0,4 µg/mL, indica un basso livello di resistenza all'isoniazide.	Nessun intervento
	Resistente	L'isolato è stato testato con il sistema **BACTEC MGIT** (isoniazide 0,4 µg/mL) ed è risultato resistente.	Nessun intervento
	Errore(X)	Nessun referto.	Ripetere il test

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il test di sensibilità del sistema **BACTEC MGIT** non interpreta il grado di sensibilità dell'isolato analizzato. I risultati vengono riportati come S (sensibile) o R (resistente) per il farmaco e la concentrazione del test.

Al fine di evitare l'incidenza di falsa sensibilità, il test **BACTEC MGIT** 960 SIRE è stato sviluppato con concentrazioni critiche di streptomicina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo leggermente inferiori rispetto alle concentrazioni critiche usate nel metodo delle proporzioni. L'analisi a concentrazioni più elevate, come consigliato, migliora la capacità di individuare gli isolati con basso livello di resistenza.

I test di sensibilità del sistema **BACTEC MGIT** possono essere eseguiti solo con uno strumento **BACTEC MGIT**. Non è possibile leggere manualmente i risultati dei set AST.

Usare solo colture pure di *M. tuberculosis*, in quanto le colture contaminate o contenenti ceppi multipli di micobatteri possono dare luogo a risultati errati e non devono pertanto essere analizzate. Non si consiglia l'analisi diretta da campioni clinici.

Prima di standardizzare le sospensioni preparate da terreni solidi, lasciarle riposare per il tempo stabilito. Gli inoculi preparati da terreni solidi devono essere esaminati visivamente a fronte di uno standard di torbidità McFarland 0,5, altrimenti possono dar luogo a risultati non accurati o errati del set AST.

La mancata diluizione 1:5 della sospensione batterica, se indicata, per l'inoculo delle provette di farmaco, può dar luogo a risultati non accurati.

La mancata diluizione 1:100 della sospensione batterica per l'inoculo della provetta del Controllo di crescita, può dar luogo a risultati non accurati o errati del set AST.

La mancata ricostituzione dei farmaci con il volume corretto di acqua distillata/deionizzata sterile può dar luogo a risultati non accurati.

È importante che il contenuto delle provette inoculate sia mescolato bene, in quanto una miscelazione inadeguata può dar luogo a falsi risultati di resistenza.

Il mancato caricamento delle provette del set AST nel carrello secondo l'ordine appropriato può dar luogo a risultati non accurati. La selezione di una definizione errata di farmaci nel carrello del set può dar luogo a risultati non validi o non accurati.

Il caricamento sbagliato del set AST nello strumento può dar luogo ad una condizione sconosciuta che deve essere risolta entro otto ore. Se la condizione non viene risolta entro otto ore, il set AST deve essere scartato e predisposto nuovamente.

Il mancato impiego del supplemento SIRE nel set AST può dar luogo a risultati non accurati. NON aggiungere il supplemento di crescita **BACTEC MGIT** nel set AST.

VALORI ATTESI

Con il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE sono stati analizzati in tutto 106 isolati clinici di *M. tuberculosis* presso quattro centri in diverse aree geografiche. Nell'analisi sono stati inclusi isolati clinici freschi e isolati stock da terreni di coltura liquidi e solidi. Nel corso di analisi separate, 200 test di sensibilità (supporto liquido e solido) sono stati eseguiti a concentrazioni critiche di streptomicina (STR), isoniazide (INH) e rifampicina (RIF) e 223 test di sensibilità sono stati eseguiti alla concentrazione critica di etambutolo (EMB). Il tempo medio complessivo per raggiungere i risultati del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE è di sette - otto giorni, entro un intervallo di quattro - quattordici giorni. I dati sono illustrati nella Figura 1, alla fine del foglietto illustrativo.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Studi analitici

Intervallo di concentrazione per inoculi AST su terreni liquidi e solidi

Terreni liquidi – Per preparare un set AST da una provetta **MGIT** da 7 mL positiva, la procedura consigliata prevede l'impiego di un inoculo diretto nel Giorno 1 e nel Giorno 2 post-positività e di un inoculo diluito (1:5) dal Giorno 3 al Giorno 5 post-positività. Gli studi interni indicano che gli inoculi preparati dal Giorno 1 al giorno 5 da una provetta **MGIT** da 7 mL positiva rientrano in un range tra 0,8 x 10^5 e 3,2 x 10^5 CFU/mL.

Terreni solidi – Per preparare un set AST da una crescita di terreni solidi (fino a 14 giorni), la procedura consigliata prevede l'impiego di una diluizione 1:5 di una sospensione di batteri equivalente ad uno standard 0,5 McFarland. Gli studi interni indicano che gli inoculi preparati da coltura su terreno solido sono compresi in un range tra 1,4 x 10^5 e 2,4 x 10^6 CFU/mL.

Riproducibilità dei lotti

La riproducibilità dei lotti è stata valutata usando venticinque isolati di *M. tuberculosis* (per includere cinque ceppi ATCC). Ciascun test **BACTEC MGIT** 960 SIRE alla concentrazione critica di farmaco è stato eseguito in triplicato per un totale di settantacinque risultati per farmaco. Ogni replicato ha rappresentato una condizione di analisi separata, differenziata in base ai lotti di farmaco SIRE e supplemento SIRE utilizzati (tre lotti di ciascuno).

Gli isolati risultati resistenti a streptomicina, isoniazide e etambutolo nel test iniziale sono stati successivamente analizzati con la concentrazione di farmaco più elevata, ad eccezione dei ceppi ATCC. Oltre agli isolati resistenti testati, sono stati inclusi nel profilo di sensibilità del test anche due isolati sensibili a STR (concentrazione critica), due sensibili a INH (concentrazione critica) e due sensibili a EMB (concentrazione critica). I risultati osservati sono stati confrontati con i risultati attesi.

La riproducibilità complessiva per ciascun farmaco alla concentrazione critica è del 96% per STR, 100% per INH, 100% per RIF e 100% per EMB. La riproducibilità complessiva per ciascun farmaco alla concentrazione elevata è del 96% per STR 4.0 e del 100% per INH 0.4.

Test con pannello CDC di confronto

Le prestazioni del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE sono state valutate utilizzando un pannello con isolati di confronto ottenuto dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC), GA, USA. Il pannello era costituito da trenta isolati di *M. tuberculosis* con pattern di sensibilità accertati (con il metodo delle proporzioni). Il pannello è stato testato due volte con il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE ed entrambi i risultati sono stati concordi. I risultati dei test **BACTEC MGIT** 960 SIRE sono stati confrontati con i risultati attesi dei CDC.

La concordanza complessiva con i risultati attesi dei CDC per ciascun farmaco alla concentrazione critica è del 93% per STR, 100% per INH, 100% per RIF e 100% per EMB. La concordanza complessiva con i risultati attesi del CDC per ciascun farmaco alla concentrazione elevata è del 100% per STR 4.0 e del 100% per INH 0.4.

Valutazione clinica

Il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE è stato valutato presso quattro centri in aree geografiche diverse, tra cui centri regionali di riferimento, laboratori di ospedali universitari e un centro all'estero. Il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE è stato confrontato con il test di sensibilità eseguito con il metodo delle proporzioni.[2] I farmaci inclusi nella valutazione iniziale sono stati streptomicina, isoniazide e rifampicina. Per l'etambutolo è stata eseguita una valutazione a parte.

Riproducibilità del test

La riproducibilità del test **BACTEC MGIT** 960 SIRE è stata valutata presso i centri clinici utilizzando un pannello di dieci isolati qualificati, inclusi vari isolati resistenti a ciascuno dei farmaci. I risultati dei test **BACTEC MGIT** 960 SIRE sono stati confrontati con i risultati attesi. La riproducibilità complessiva per ciascun farmaco alla concentrazione critica è del 98,9% per STR, 99,7% per INH, 99,2% per RIF e 97,5% per EMB. La riproducibilità presso i singoli centri è rientrata in un range da 89,9% a 100% per i risultati combinati dei farmaci alla concentrazione critica. La riproducibilità complessiva per ciascun farmaco alla concentrazione elevata è del 99,7% per STR 4.0 e del 95,6% per INH 0.4 La riproducibilità presso i singoli centri è rientrata in un range da 92,2% a 100% per i risultati combinati dei farmaci alla concentrazione elevata.

Test con pannello CDC di confronto

Le prestazioni del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE sono state valutate utilizzando un pannello con isolati di confronto ottenuto dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC), GA, USA. Il pannello era costituito da trenta isolati di *M. tuberculosis* con pattern di sensibilità accertati (con il metodo delle proporzioni), testati da ciascun centro clinico.

La tabella 1 illustra la conformità del test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE per ciascun farmaco rispetto ai risultati attesi dei CDC.

Tabella 1 – Pannello CDC di confronto – Test BACTEC MGIT 960 presso i centri clinici

MGIT 960	Numero di analisi	Numero corretto	% corretta
STR 1.0	120	111	92,5
INH 0.1	120	119	99,2
RIF 1.0	120	120	100
EMB 5.0	119	111	93,3
STR 4.0	29*	29	100
INH 0.4	87*	82	94,3

* Solo isolati resistenti a concentrazioni cliniche, testati con STR 4.0 e INH 0.4.

Test di isolati clinici

Con il test di sensibilità **BACTEC MGIT** 960 SIRE e con il test di sensibilità con il metodo delle proporzioni sono stati analizzati in tutto 106 isolati clinici di *M. tuberculosis*. Nell'analisi sono stati inclusi isolati clinici freschi e isolati stock da terreni di coltura liquidi e solidi, che hanno generato un totale di 195 risultati per il test iniziale di sensibilità eseguito per streptomicina, isoniazide, rifampicina (concentrazione critica). Una valutazione separata dell'etambutolo è stata eseguita sia da aliquote congelate di isolati clinici originali e di isolati stock che da isolati clinici prospettici da terreni di coltura liquidi e solidi. Per il test dell'etambutolo alla concentrazione critica sono stati generati complessivamente 223 risultati.

La Tabella 2 presenta i risultati ottenuti dai test di isolati clinici per ciascun farmaco (concentrazione critica) provenienti dai terreni di coltura liquidi. La Tabella 3 presenta i risultati ottenuti dai test di isolati clinici per ciascun farmaco (concentrazione critica) provenienti dai terreni di coltura solidi.

Tabella 2 – Risultati di isolati clinici – Test BACTEC MGIT 960 AST confrontato al metodo delle proporzioni su isolati da terreni di coltura liquidi

	Metodo delle proporzioni			Sistema MGIT 960 AST				
					Risultati di sensibilità		Risultati di resistenza	
FAR-MACO	Concen-trazione	S	R	Concen-trazione	N. di concordanze	% di concordanza (95% CI)	N. di concordanze	% di concordanza (95% CI)
STR	2,0 µg/mL	69	27	1,0 µg/mL	62	90 (80–96)	26	96 (81–100)
INH	0,2 µg/mL	59	37	0,1 µg/mL	57	97 (88–100)	36	97 (86–100)
RIF	1,0 µg/mL	72	24	1,0 µg/mL	71	99 (93–100)	24	100 (95–100)
EMB	5,0 µg/mL	91	20	5,0 µg/mL	88	97 (91–99)	17	85 (62–97)

Tutti gli isolati con risultati **MGIT** discordi sono stati testati con il metodo delle proporzioni presso due centri indipendenti. Dei sette isolati STR resistenti discordi (R-960, S-Metodo delle proporzioni), tre sono risultati resistenti presso entrambi i centri e uno è risultato sensibile presso entrambi i centri. Gli altri tre sono risultati resistenti

presso un centro e sensibili presso l'altro. L'isolato STR sensibile discorde (S-960, R-Metodo delle proporzioni) è risultato sensibile presso entrambi i centri. I due isolati INH resistenti discordi (R-960, S-Metodo delle proporzioni) sono risultati sensibili presso entrambi i centri. L'isolato INH sensibile discorde (S-960, R-Metodo delle proporzioni) è risultato sensibile presso entrambi i centri. L'isolato RIF resistente discorde (R-960, S-Metodo delle proporzioni) è risultato resistente presso entrambi i centri. I tre isolati EMB resistenti discordi (R-960, S-Metodo delle proporzioni) sono risultati sensibili presso entrambi i centri. Dei tre risultati EMB sensibili discordi (S-960, R-Metodo delle proporzioni), due sono risultati sensibili presso entrambi i centri e uno è risultato resistente presso un centro e sensibile presso l'altro.

Tabella 3 – Risultati di isolati clinici – Test BACTEC MGIT 960 AST confrontato al metodo delle proporzioni su isolati da terreni di coltura solidi

	Metodo delle proporzioni			Sistema MGIT 960 AST				
					Risultati di sensibilità		Risultati di resistenza	
FARMACO	Concentrazione	S	R	Concentrazione	N. di concordanze	% di concordanza (95% CI)	N. di concordanze	% di concordanza (95% CI)
STR	2,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	65	93 (84–98)	28	97 (82–100)
INH	0,2 µg/mL	63	36	0,1 µg/mL	62	98 (92–100)	35	97 (86–100)
RIF	1,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	70	100 (95–100)	26	90 (73–98)
EMB	5,0 µg/mL	87	25	5,0 µg/mL	86	99 (94–100)	20	80 (59–93)

Tutti gli isolati con risultati **MGIT** discordi sono stati testati con il metodo delle proporzioni presso due centri indipendenti. Dei cinque isolati STR resistenti discordi (R-960, S-Metodo delle proporzioni), due sono risultati resistenti presso entrambi i centri e uno è risultato sensibile presso entrambi i centri. Gli altri due sono risultati resistenti presso un centro e sensibili presso l'altro. L'isolato STR sensibile discorde (S-960, R-Metodo delle proporzioni) è risultato resistente presso entrambi i centri. L'isolato INH resistente discorde (R-960, S-Metodo delle proporzioni) è risultato sensibile presso entrambi i centri. L'isolato INH sensibile discorde (S-960, R-Metodo delle proporzioni) è risultato resistente presso entrambi i centri. I tre isolati RIF sensibili discordi (S-960, R-Metodo delle proporzioni) sono risultati sensibili presso entrambi i centri. L'isolato EMB resistente discorde (R-960, S-Metodo delle proporzioni) è risultato resistente presso entrambi i centri. Dei cinque isolati EMB sensibili discordi (S-960, R-Metodo delle proporzioni), quattro sono risultati sensibili presso entrambi i centri. L'altro isolato è risultato resistente presso un centro e sensibile presso l'altro.

La Tabella 4 presenta i risultati ottenuti dai test di isolati clinici per streptomicina e isoniazide (concentrazione elevata) provenienti da terreni di coltura liquidi. La Tabella 5 presenta i risultati ottenuti dai test di isolati clinici per streptomicina e isoniazide (concentrazione elevata) provenienti da terreni di coltura solidi.

Tabella 4 – Risultati di isolati clinici – Test BACTEC MGIT 960 AST confrontato al metodo delle proporzioni su isolati da terreni di coltura liquidi

	Metodo delle proporzioni			Sistema MGIT 960 AST				
					Risultati di sensibilità		Risultati di resistenza	
FARMACO	Concentrazione	S	R	Concentrazione	N. di concordanze	% di concordanza (95% CI)	N. di concordanze	% di concordanza (95% CI)
STR	10,0 µg/mL	77	19	4,0 µg/mL	73*	95 (87–99)	17	90 (67–99)
INH	1,0 µg/mL	65	31	0,4 µg/mL	65*	100 (95–100)	29	94 (79–99)

* Presume un risultato **MGIT** S per farmaco a concentrazione elevata per tutti gli isolati con risultato **MGIT** S per farmaco a bassa concentrazione.

Tutti gli isolati con risultati **MGIT** discordi sono stati testati con il metodo delle proporzioni presso due centri indipendenti. I quattro isolati STR resistenti discordi (R-960, S-Metodo delle proporzioni) sono risultati sensibili presso entrambi i centri. Dei cinque isolati STR sensibili discordi (S-960, R-Metodo delle proporzioni), uno è risultato sensibile presso entrambi i centri e uno è risultato resistente presso entrambi i centri. Dei due isolati INH sensibili discordi (S-960, R-Metodo delle proporzioni), uno è risultato sensibile presso entrambi i centri e uno è risultato resistente presso entrambi i centri.

Tabella 5 – Risultati di isolati clinici – Test BACTEC MGIT 960 AST confrontato al metodo delle proporzioni su isolati da terreni di coltura solidi

	Metodo delle proporzioni			Sistema MGIT 960 AST				
					Risultati di sensibilità		Risultati di resistenza	
FARMACO	Concentrazione	S	R	Concentrazione	N. di concordanze	% di concordanza (95% CI)	N. di concordanze	% di concordanza (95% CI)
STR	10,0 µg/mL	78	21	4,0 µg/mL	73*	94 (86–98)	17	81 (58–95)
INH	1,0 µg/mL	68	31	0,4 µg/mL	68*	100 (95–100)	30	97 (83–100)

* Presume un risultato **MGIT** S per farmaco a concentrazione elevata per tutti gli isolati con risultato **MGIT** S per farmaco a bassa concentrazione.

Tutti gli isolati con risultati **MGIT** discordi sono stati testati con il metodo delle proporzioni presso due centri indipendenti. I cinque isolati STR resistenti discordi (R-960, S-Metodo delle proporzioni) sono risultati sensibili presso entrambi i centri. Dei quattro isolati STR sensibili discordi (S-960, R-Metodo delle proporzioni), tre sono risultati sensibili presso entrambi i centri e uno è risultato resistente presso entrambi i centri. L'isolato INH sensibile discorde (S-960, R-Metodo delle proporzioni) è risultato resistente presso entrambi i centri.

DISPONIBILITÀ

Nº cat.	Descrizione
245123	Kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE, confezione da 4 flaconi di antibiotici liofilizzati e 8 flaconi di Supplemento SIRE.
245125	Kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0, confezione da 1 flacone di antibiotico liofilizzato e 2 flaconi di Supplemento SIRE.
245157	Kit **BACTEC MGIT** 960 IR, confezione da 2 flaconi di antibiotico liofilizzato e 4 flaconi di Supplemento SIRE.
245126	Kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4, confezione da 1 flacone di antibiotico liofilizzato e 2 flaconi di Supplemento SIRE.

RIFERIMENTI : Vedere la sezione "References" nel testo inglese.

BD BACTEC MGIT 960 SIRE Kits
Para o Teste da Sensibilidade Anti-micobacteriana do *Mycobacterium tuberculosis*

Português

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit (Conjunto de SIRE **BACTEC MGIT** 960) é um procedimento qualitativo rápido para o teste de sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* em cultura, à estreptomicina (STR), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) e etambutol (EMB). O **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 Kit e o **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 Kit destinam-se à realização de testes com concentrações de fármaco mais elevadas.

Os kits de teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 são utilizados com os sistemas **BACTEC MGIT** 960 e **BACTEC MGIT** 320.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O teste de sensibilidade anti-micobacteriana é importante para o tratamento adequado de doentes com tuberculose. O tratamento da tuberculose é frequentemente realizado através de um regime com vários fármacos que inclui os fármacos anti-micobacterianos estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol. É importante que os fármacos anti-micobacterianos prescritos demonstrem uma actividade apropriada contra o *Mycobacterium tuberculosis*, ou seja, que exista sensibilidade do isolado ao fármaco.

O *Mycobacterium tuberculosis* resistente a vários fármacos (MDR-TB) tornou-se recentemente num grave problema de saúde pública.[1] A resistência a qualquer um dos fármacos principais, a estreptomicina (STR), a isoniazida (INH), a rifampicina (RIF) e o etambutol (EMB) tornam o tratamento da doença mais difícil e mais caro. A rápida detecção destes isolados resistentes é essencial para um tratamento eficaz do doente.

Existem dois métodos que têm sido amplamente usados no teste da sensibilidade anti-micobacteriana. O primeiro método, conhecido como o Método de Proporção,[2] utiliza Agar de Middlebrook e Cohn 7H10. Compara a contagem de colónias entre meios contendo fármaco e meios isentos de fármaco. A resistência a um fármaco é detectada quando uma percentagem de 1% ou mais da população bacteriana é resistente à

concentração do fármaco que está a ser testado. Normalmente, os resultados estão disponíveis após 21 dias de incubação. O segundo método, conhecido como o método de sensibilidade radiométrica **BACTEC** 460TB[3] tem geralmente uma duração de 4 a 12 dias. Baseia-se na produção de dióxido de carbono radioactivo marcado com ^{14}C por parte das micobactérias em desenvolvimento, o que se manifesta por um aumento do índice de crescimento no sistema.

Historicamente, o procedimento de Método de Proporção (MOP) incluiu o teste de sensibilidade do *M. tuberculosis* utilizando duas concentrações de antimicrobianos. O Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, anteriormente NCCLS) continua a recomendar que o procedimento MOP inclua duas concentrações dos fármacos primários para teste, excepto a rifampina. Geralmente, as concentrações baixas recomendadas para o procedimento MOP são concentrações críticas para estes fármacos. A concentração crítica é definida como a concentração de fármaco que permite a interpretação de um resultado como resistente ou sensível. Um isolado é determinado como resistente se 1% ou mais da população de teste cresce na presença da concentração crítica do fármaco. Utiliza-se a concentração elevada do fármaco para obter um perfil do grau de resistência dentro da população. Este resultado faculta informações ao médico para ajudar a determinar se é necessária modificação do regime terapêutico.

O teste **BACTEC MGIT** 960 SIRE fornece o resultado da sensibilidade dentro do mesmo prazo que o Sistema **BACTEC** 460TB. Além disso, este método é não radiométrico, permitindo, na maioria dos casos, a obtenção mais precoce de resultados apropriados da sensibilidade, do que no procedimento MOP.

O teste **BACTEC MGIT** 960 SIRE foi desenvolvido com concentrações críticas para estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol, que são ligeiramente inferiores às concentrações críticas utilizadas no MOP, para evitar uma falsa sensibilidade. Tal é mais aparente para estreptomicina, onde muitos isolados estão próximos da concentração crítica recomendada, conforme efectuado por MOP. Por esta razão, foi desenvolvida uma segunda concentração de fármaco, mais elevada, para estreptomicina e isoniazida. Pode ser efectuado o relatório de um resultado sensível na concentração crítica, não sendo necessários outros testes. Os isolados que são resistentes com a concentração crítica de estreptomicina, etambutol e/ou isoniazida devem ser testados com uma concentração de fármaco mais elevada no Sistema **BACTEC MGIT** ou utilizando um método alternativo. Neste caso, pode ser efectuado o relatório de um resultado final de resistência na concentração crítica com a notificação de que está a ser efectuado um teste suplementar na concentração elevada.

O teste de isolados resistentes com uma concentração mais elevada é importante para identificar os que apresentam resistência de baixo nível, ou seja, resistentes com a concentração crítica e sensíveis com a concentração elevada. As concentrações elevadas no Sistema **BACTEC MGIT** foram concebidas para serem inferiores às concentrações utilizadas no MOP. Esta concepção do Sistema **BACTEC MGIT** é tal que um resultado de resistência, especialmente para estreptomicina, pode nem sempre se correlacionar com um resultado de resistência com a concentração elevada no MOP. Caso se obtenha um resultado de estreptomicina que é resistente à concentração elevada, deve ser efectuado um método alternativo de teste com esta concentração.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O **BBL MGIT** 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tube (Tubo Indicador do Crescimento de Micobactérias) é um tubo que contém um Middlebrook 7H9 Broth (Meio Líquido Middlebrook 7H9) modificado que sustenta o crescimento e o isolamento de micobactérias (consulte o folheto informativo do **BBL MGIT** 7 mL). O tubo do **MGIT** contém um composto fluorescente embebido em silicone, no fundo de um tubo de 16 x 100 mm com base redonda. O composto fluorescente é sensível à presença de oxigénio dissolvido no caldo. A concentração inicial de oxigénio dissolvido atenua a emissão proveniente do composto, tornando possível detectar um reduzido grau de fluorescência. Subsequentemente, microrganismos com proliferação e respiração activa consomem o oxigénio, o que permite que o composto desenvolva fluorescência.

O **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit é um teste qualitativo com 4 a 13 dias de duração. O teste baseia-se no crescimento de isolados de *M. tuberculosis* num tubo contendo fármaco, que é comparado com um tubo isento de fármaco (Controlo do Crescimento). O instrumento **BACTEC MGIT** monitoriza os tubos relativamente a um aumento da fluorescência. A análise da fluorescência no tubo contendo fármaco, comparativamente com a fluorescência presente no tubo de Controlo de Crescimento, é usada pelo instrumento para determinar os resultados da sensibilidade.

O instrumento **BACTEC MGIT** interpreta estes resultados automaticamente e reporta um resultado de sensível ou resistente.

REAGENTES

O **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit contém um frasco liofilizado de cada um dos seguintes antibióticos: estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol e oito frascos de SIRE Supplement (Suplemento SIRE).

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Estreptomicina ....332 µg

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Isoniazida ....33,2 µg

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Rifampicina ....332 µg

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Etambutol ....1660 µg

BACTEC MGIT 960 IR Kit contém um frasco liofilizado de cada um de isoniazida e rifampicina e quatro frascos de SIRE Supplement.

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Isoniazida ....33,2 µg

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Rifampicina ....332 µg

BACTEC MGIT 960 STR 4.0 Kit contém um Frasco liofilizado de estreptomicina e dois frascos de SIRE Supplement.

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Estreptomicina ....664 µg

BACTEC MGIT 960 INH 0.4 Kit contém um Frasco liofilizado de isoniazida e dois frascos de SIRE Supplement.

Fórmula Aproximada* Por Frasco de Fármaco Liofilizado: Isoniazida ....66,4 µg

O **BACTEC MGIT** 960 SIRE Supplement é enriquecido com 20 mL de Middlebrook OADC.

Fórmula* Aproximada por 1 L de Água Purificada

Albumina bovina	50,0 g	Catalase	0,03 g
Dextrose	20,0 g	Ácido Oleico	0,6 g

**Ajustado e/ou suplementado conforme necessário para cumprir os critérios de desempenho.*

Conservação e reconstituição dos reagentes: Frascos de Fármaco **BACTEC MGIT** 960 SIRE – após recepção, conservar os frascos de fármaco liofilizado entre 2 e 8°C. Após reconstituição, as soluçãos antibióticas podem ser congeladas e conservadas a -20°C ou menos durante um período máximo de seis meses, não excedendo o prazo de validade original. Depois de descongelar, usar de imediato. Descartar o que não se utilizar.

Após a recepção, armazene o **BACTEC MGIT** SIRE Supplement entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz. Evite congelar ou aquecer excessivamente. Abrir e usar antes do final do prazo de validade. Minimizar a exposição à luz.

Instruções de Utilização:

Reconstitua cada frasco de fármaco liofilizado de Estreptomicina do **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit com **4 mL** de água destilada/desionizada estéril para produzir uma solução stock de 83 µg/mL.

Reconstitua cada frasco de fármaco liofilizado de Isoniazida do **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit com **4 mL** de água destilada/desionizada estéril para produzir uma solução stock de 8,3 µg/mL.

Reconstitua cada frasco de fármaco liofilizado de Rifampicina do **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit com **4 mL** de água destilada/desionizada estéril para produzir uma solução stock de 83 µg/mL.

Reconstitua cada frasco de fármaco liofilizado de Etambutol do **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit com **4 mL** de água destilada/desionizada estéril para produzir uma solução stock de 415 µg/mL.

NOTA: Os frascos seguintes são reconstituídos com um volume diferente. A utilização de um volume incorrecto de água destilada estéril para a reconstituição das concentrações de fármaco mais elevadas invalidará os resultados do teste.

Reconstitua cada frasco de fármaco liofilizado de Estreptomicina do **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 Kit com **2 mL** de água destilada/desionizada estéril para produzir uma solução stock de 332 µg/mL.

Reconstitua cada frasco de fármaco liofilizado de Isoniazida do **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 Kit com **2 mL** de água destilada/desionizada estéril para produzir uma solução stock de 33,2 µg/mL.

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in-vitro*

AMOSTRA DE TESTE POTENCIALMENTE INFECCIOSA: Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"[4-7] e as linhas de orientação da instituição.

O trabalho com crescimento de *M. tuberculosis* em cultura requer práticas de Biossegurança de Nível 3 (BSL), equipamento e instalações de contenção.

Ler e cumprir as instruções presentes em todos os folhetos informativos relevantes, incluindo o Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias **BBL MGIT**, de 7 mL.

Antes usar, o utilizador deverá examinar os tubos e frascos relativamente a sinais de contaminação ou danos. Rejeitar qualquer tubo ou frasco que pareça inadequado. Tubos que caiam deverão ser analisados cuidadosamente. Se forem observados danos, o tubo deverá ser descartado.

Em caso de quebra do tubo: 1) Fechar as gavetas do instrumento; 2) Desligar o instrumento; 3) Desocupar a área de imediato; 4) Consultar as normas da instituição/CDC. Um tubo inoculado que apresente fugas ou se encontre partido pode produzir aerossóis de micobactérias; o frasco deverá ser manipulado de forma apropriada.

Submeter todos os tubos **MGIT** inoculados ao autoclave antes de proceder ao seu descarte.

PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Todas as preparações que se descrevem em baixo devem ser provenientes de culturas puras de *M. tuberculosis*. O laboratório deverá confirmar, através de técnicas de identificação adequadas, que o isolado a testar consiste numa cultura pura de *M. tuberculosis*.

O inóculo pode ser preparado a partir de meio sólido ou de um tubo positivo **BACTEC MGIT** de 7 mL. Para além disso, as culturas desenvolvidas em meios líquidos e em meios sólidos podem ser utilizadas para preparar um tubo de sementeira **MGIT**, o qual poderá ser utilizado para preparar o inóculo. Cada uma destas opções é descrita em seguida.

Preparação do Inóculo a partir de Meios Sólidos:

NOTA: É importante preparar o inóculo de acordo com as instruções que se seguem, para obter a concentração de microrganismos adequada para o teste de sensibilidade.

1. Adicionar 4 mL de **BBL** Middlebrook 7H9 Broth (ou meio líquido **BBL MGIT**) a um tubo estéril de 16,5 x 128 mm com tampa, contendo 8 a 10 esferas de vidro.
2. Raspar, usando uma ansa estéril, o máximo número de colónias possível, com um período de crescimento inferior a 14 dias, tentando não retirar o meio sólido. Suspender as colónias em Middlebrook 7H9 Broth.
3. Levar a suspensão ao misturador automático durante 2 a 3 min para desintegrar os aglomerados de maior dimensão. A turvação da suspensão deverá ser superior à de um padrão 1,0 de McFarland.
4. Deixar a suspensão repousar durante 20 min, sem perturbação.
5. Transferir o líquido do sobrenadante para outro tubo estéril de 16,5 x 128 mm com tampa (evitar transferir qualquer parte do sedimento) e deixar assentar mais 15 min.
6. Transferir o líquido sobrenadante (deverá ter um aspecto homogéneo, isento de aglomerados) para um terceiro tubo estéril de 16,5 x 128 mm. NOTA: Neste passo, a suspensão de microrganismos deverá ser superior à de um padrão 0,5 de McFarland.
7. Ajustar a suspensão para um padrão 0,5 de McFarland, recorrendo a comparação com um padrão de turvação 0,5 de McFarland. Não ajuste abaixo de um padrão 0,5 de McFarland.
8. Diluir 1 mL da suspensão ajustada em 4 mL de solução salina estéril (diluição a 1:5). Consulte "Procedimento de Inoculação para o Teste de Sensibilidade".

Preparação do Inóculo a partir de um Tubo Positivo BACTEC MGIT de 7 mL:

NOTA: É importante preparar o inóculo utilizando as referências de tempo que se seguem, para obter a concentração de microrganismos adequada para o teste de sensibilidade.

1. O primeiro dia de um tubo **MGIT** positivo no instrumento é considerado como Dia 0.
2. Para a preparação do inóculo de teste, deverá usar-se um tubo positivo **MGIT** de 7 mL desde o dia **seguinte** ao primeiro dia de resultado positivo no instrumento **BACTEC MGIT** (Dia 1) e até ao quinto dia (Dia 5), inclusivé, após o instrumento revelar positividade. Um tubo positivo durante mais de cinco dias deverá ser objecto de subcultura num tubo fresco **MGIT** de 7 mL que contenha Suplemento de Crescimento **BACTEC MGIT** e testado no instrumento **BACTEC MGIT** até se tornar positivo, procedendo-se subsequentemente à sua utilização entre o primeiro a quinto dias de positividade. Consulte "Preparação de um Tubo de Sementeira **MGIT** a partir de Meio Líquido".

3. Se o tubo for um positivo para o Dia 1 ou Dia 2, utilizar uma suspensão de meio líquido **MGIT** para os procedimentos de inoculação. Homogeneizar bem. Prossiga para o “Procedimento de Inoculação para o Teste de sensibilidade”.
4. Se o tubo for positivo do Dia 3, Dia 4 ou Dia 5, misturar bem e diluir 1 mL do meio líquido positivo em 4 mL de solução salina estéril (diluição a 1:5). Homogeneizar bem o tubo. Usar a suspensão diluída para os procedimentos de inoculação. Prossiga para o “Procedimento de Inoculação para o Teste de sensibilidade”.

Preparação de um Tubo de Sementeira MGIT a partir de Meio Líquido:

1. Homogeneizar o tubo através de inversão ou com vortex.
2. Diluir a 1:100 com adição de 0,1 mL de cultura a 10 mL de Meio Líquido **BBL** Middlebrook 7H9 ou Meio Líquido **BBL MGIT**. Homogeneizar bem.
3. Adicionar 0,5 mL desta suspensão a um tubo **MGIT** de 7 mL suplementado com 0,8 mL de Suplemento de Crescimento **BACTEC MGIT**.
4. Tapar firmemente e homogeneizar suavemente com 2 a 3 inversões.
5. Introduzir o tubo num instrumento **BACTEC MGIT** e efectuar o teste até obter um positivo.

   NOTA: O tempo até à positividade **deve ser** ≥ 4 dias para a utilização como inóculo AST. Se o tubo ficar positivo em < 4 dias, regressar ao passo 1 e preparar um novo tubo de sementeira.
6. Este tubo poderá então ser utilizado dentro de 1 a 5 dias após obter a positividade. Consulte "Preparação do Inóculo a partir de um Tubo Positivo **BACTEC MGIT** de 7 mL" acima.

Preparação de um Tubo de Sementeira MGIT a partir de Meio Sólido:

1. Raspar o crescimento de um tubo inclinado com uma ansa estéril e adicionar a um tubo **MGIT** de 7 mL suplementado com 0,8 mL de Suplemento de Crescimento **BACTEC MGIT**.
2. Tapar firmemente e homogeneizar suavemente com 2 a 3 inversões.
3. Introduzir o tubo num instrumento **BACTEC MGIT** e efectuar o teste até obter um positivo.

   NOTA: O tempo até à positividade **deve ser** ≥ 4 dias para a utilização como inóculo AST. Se o tubo ficar positivo em < 4 dias, regressar ao passo 1 e preparar um novo tubo de sementeira.
4. Este tubo poderá então ser utilizado dentro de 1 a 5 dias após obter a positividade. Consulte "Preparação do Inóculo a partir de um Tubo Positivo **BACTEC MGIT** de 7 mL" acima.

PROCEDIMENTO

Material Fornecido: O **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit contém um frasco liofilizado de cada um dos fármacos e oito frascos de SIRE Supplement (aproximadamente 40 testes por fármaco, por conjunto). O **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 contém um frasco de fármaco liofilizado e dois frascos de SIRE Supplement (aproximadamente 20 testes por conjunto) e o **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 Kit contém um frasco de cada fármaco liofilizado e dois frascos de SIRE Supplement (aproximadamente 20 testes por conjunto).

Material Necessário mas Não Fornecido: BBL MGIT 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tubes (Tubos Indicadores do Crescimento de Micobactérias **BBL MGIT** de 7 mL), meios de cultura auxiliares, reagentes, organismos de controlo da qualidade e equipamento de laboratório necessário para este procedimento.

Procedimento de Inoculação para o Teste de sensibilidade do BACTEC MGIT 960 SIRE Kit:

1. Identifique cinco tubos **MGIT** de 7 mL para cada isolado do teste. Identifique um tubo como CC (Controlo do crescimento), um como STR, um como INH, um como RIF e um como EMB. Coloque os tubos na sequência correcta no suporte do conjunto AST de tamanho apropriado (consulte o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**).
2. Adicione, de forma asséptica, 0,8 mL de **BACTEC MGIT** SIRE Supplement a cada tubo. NOTA: É importante usar o suplemento fornecido com o conjunto.
3. Pipete, de forma asséptica, utilizando uma micropipeta, 100 µL de solução **MGIT** STR a 83 µg/mL para o tubo **MGIT** com a identificação apropriada. Pipete, de forma asséptica,100 µL de solução **MGIT** INH a 8,3 µg/mL para o tubo **MGIT** com a identificação apropriada. Pipete, de forma asséptica,100 µL de solução **MGIT** RIF a 83 µg/mL para o tubo **MGIT** com a identificação apropriada. Pipete, de forma asséptica,100 µL de solução **MGIT** EMB a 415 µg/mL para o tubo **MGIT** com a identificação apropriada. É importante adicionar o fármaco correcto ao tubo correspondente. Não devem ser adicionados antibióticos ao tubo CC **MGIT**.

Medicamento	Concentração do Fármaco após Reconstituição*	Volume Adicionado aos Tubos MGIT para Teste	Concentração Final nos Tubos MGIT
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1 µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0 µg/mL

* Estes fármacos devem ser reconstituídos utilizando **4 mL** de água estéril/desionizada para atingir as concentrações indicadas.

4. **Preparação e inoculação do tubo de Controlo do Crescimento:** Pipetar, de forma asséptica, 0,1 mL de suspensão do organismo (consulte "**PREPARAÇÃO DO INÓCULO**") para dentro de 10 mL de soro fisiológico estéril para preparar a suspensão de Controlo do Crescimento a 1:100. Homogeneizar a suspensão de Controlo do Crescimento por completo. Inocule **0,5** mL da suspensão de Controlo do Crescimento a 1:100 para dentro do tubo **MGIT** identificado como "CC".
5. **Inoculação do tubo contendo fármaco:** Pipete, de forma asséptica, 0,5 mL de suspensão do organismo (consulte "**PREPARAÇÃO DO INÓCULO**") para dentro de cada um dos QUATRO tubos de fármaco restantes (STR, INH, RIF, EMB).
6. Voltar a tapar os tubos firmemente. Homogeneizar os tubos por completo através de inversão suave, três a quatro vezes.
7. Introduza o conjunto AST dentro do Instrumento **BACTEC MGIT** utilizando a função de entrada do conjunto AST (consulte o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**). Certifique-se de que a disposição dos tubos no Suporte do Conjunto AST está de acordo com as definições do Suporte do Conjunto seleccionadas durante a execução da função de entrada do conjunto AST.
8. Riscar 0,1 mL da suspensão do microrganismo numa placa de **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (Agar de Soja de **Trypticase** com 5% de Sangue de Ovelha) (TSA II). Fechar num saco de plástico. Incubar entre 35 e 37°C.
9. Analisar a placa de agar de sangue decorridas 48 h relativamente à presença de contaminação bacteriana. Se o agar do sangue não apresentar crescimento, prosseguir com o teste AST. Se a placa de agar de sangue apresentar crescimento, descartar o conjunto AST (consultar o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**) e repetir o teste com uma cultura pura.

Procedimento de Inoculação para o Teste de sensibilidade dos BACTEC MGIT 960 STR 4.0 e INH 0.4 Kits:

Recomenda-se que, se se verificar alguma resistência na concentração crítica, seja efectuado um teste com perfil de sensibilidade o qual, no mínimo, testa a concentração elevada do fármaco à qual houve uma resistência inicial do isolado.

Fonte do Isolado: O isolado utilizado neste teste deve ser preparado conforme é descrito em "**PREPARAÇÃO DO INÓCULO**". Um tubo de sementeira poderá ser preparado a partir do tubo de Controlo do Crescimento sem fármaco, do conjunto AST do isolado previamente testado, inoculando 0,5 mL para um tubo **MGIT** de 7 mL novo, contendo Suplemento de Crescimento **BACTEC MGIT**. Logo que o tubo de sementeira seja positivo no instrumento, prossiga conforme é descrito em "**PREPARAÇÃO DO INÓCULO:** Preparação a partir de um Tubo Positivo **MGIT**".

1. Identifique um número suficiente de tubos **MGIT** de 7 mL para que o isolado de teste tenha um tubo **MGIT** de CC (Controlo do Crescimento) e um tubo de fármaco **MGIT** para cada anti-microbiano testado. Coloque os tubos na sequência correcta no suporte do conjunto AST de tamanho apropriado (consulte o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**).
2. Adicione, de forma asséptica, 0,8 mL de **BACTEC MGIT** SIRE Supplement a cada tubo. NOTA: É importante usar o suplemento fornecido com o conjunto.
3. Pipete, de forma asséptica, utilizando uma micropipeta, 100 µL da solução do fármaco para o tubo **MGIT** com a identificação apropriada. É importante adicionar o fármaco correcto ao tubo correspondente. Não devem ser adicionados antibióticos ao tubo CC **MGIT**.

Medicamento	Concentração do Fármaco após Reconstituição*	Volume Adicionado aos Tubos MGIT para Teste	Concentração Final nos Tubos MGIT
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4,0 µg/mL
MGIT INH 0.4	33,2 µg/mL	100 µL	0,4 µg/mL

* Estes fármacos devem ser reconstituídos utilizando **2 mL** de água estéril/desionizada para atingir as concentrações indicadas.

4. **Preparação e inoculação do tubo de Controlo do Crescimento:** Pipetar, de forma asséptica, 0,1 mL de suspensão do organismo (consulte "**PREPARAÇÃO DO INÓCULO**") para dentro de 10 mL de soro fisiológico estéril para preparar a suspensão de Controlo do Crescimento a 1:100. Homogeneizar a suspensão de Controlo do Crescimento por completo. Inocule 0,5 mL da suspensão de Controlo do Crescimento a 1:100 para dentro do tubo **MGIT** identificado como "CC".
5. **Inoculação do tubo contendo fármaco:** Pipetar, de forma asséptica, 0,5 mL de suspensão do organismo (consulte "**PREPARAÇÃO DO INÓCULO**") para dentro dos tubos dos fármacos.
6. Voltar a tapar os tubos firmemente. Homogeneizar os tubos por completo através de inversão suave, três a quatro vezes.
7. Introduza o conjunto AST dentro do instrumento **BACTEC MGIT** utilizando a função de entrada do conjunto AST (consulte o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**). Certifique-se de que a disposição dos tubos no Suporte do Conjunto AST está de acordo com as definições do Suporte do Conjunto seleccionadas durante a execução da função de entrada do conjunto AST.
8. Espalhe 0,1 mL da suspensão do organismo num placa de **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II). Fechar num saco de plástico. Incubar entre 35 e 37°C.
9. Analisar a placa de agar de sangue decorridas 48 h relativamente à presença de contaminação bacteriana. Se o agar do sangue não apresentar crescimento, prosseguir com o teste AST. Se a placa de agar de sangue apresentar crescimento, descartar o conjunto AST (consultar o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**) e repetir o teste com uma cultura pura.

NOTA: O teste de sensibilidade pode ser configurado em vários formatos. Por exemplo, um conjunto de suporte para cinco tubos contendo apenas as concentrações críticas pode ser configurado no sistema. Podem ser configurados vários conjuntos de suporte de tubos dependendo dos testes de perfil opcionais que estão a ser executados (consultar o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**).

Controlo de Qualidade do Utilizador: Após a recepção de uma nova remessa ou de um novo número de lote de frascos do **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit, recomenda-se que o organismo de controlo apresentado em baixo seja testado. O microrganismo de controlo deve ser uma cultura pura, e a cultura deve ser preparada de acordo com as instruções de "**PREPARAÇÃO DO INÓCULO**".

O Conjunto AST de controlo de qualidade (CQ) deve ser preparado de acordo com as instruções do "Procedimento de Inoculação para o Teste de Sensibilidade" dos conjuntos de fármacos que estão a ser testados. As considerações importantes quando se prepara o Conjunto de CQ AST consistem na reconstituição adequada dos fármacos liofilizados e diluição adequada do microrganismo de CQ para os tubos de Controlo do Crescimento e fármacos.

É importante adicionar o fármaco correcto ao tubo identificado correspondente. A utilização uso do microrganismo de CQ pan-sensível não irá detectar o fármaco incorrecto pipetado para os tubos do Conjunto AST.

A observação de resultados correctos, conforme aqueles apresentados em baixo, num período de 4 a 13 dias indica que os **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kits estão prontos a serem utilizados para o teste de isolados de doentes. Se não se observarem resultados adequados, repetir o teste. Se, após repetição do teste, ainda não forem observados resultados adequados, não usar o produto até se ter contactado o o representante local da Becton Dickinson.

Estirpe	GC	MGIT STR	MGIT INH	MGIT RIF	MGIT EMB
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível

Estirpe	GC	MGIT STR 4.0	MGIT INH 0.4
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensível	Sensível

Deverá usar-se o mesmo microrganismo de controlo como grupo de CQ semanalmente, quando se efectuar o teste de sensibilidade. Se o CQ do lote falhar, não efectuar o relatório do(s) fármaco(s) que falharam durante esse período de teste. Repita o CQ para o(s) fármaco(s) e os isolados do doente afectados pela falha do CQ inicial. Se a repetição do CQ não apresentar o desempenho previsto, não participar os resultados do doente. Não usar o produto até se ter contactado o representante local da Becton Dickinson.

Durante a avaliação externa dos **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kits, as causas mais frequentes de falha de CQ consistiram em culturas de CQ foram contaminadas, Conjuntos AST hiper/hipo inoculados, fármaco não adicionado aos tubos apropriados e situações de erro do instrumento.

RESULTADOS

O instrumento **BACTEC MGIT** irá monitorizar os conjuntos de AST até que seja feita uma determinação de sensível ou resistente. Depois do teste do conjunto se concluir, os resultados serão participados pelo instrumento **BACTEC MGIT** (consultar o Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**). O instrumento **BACTEC MGIT** irá reportar um resultado do Conjunto AST como um Erro ("X"), ausência de interpretação de sensibilidade, quando ocorrerem determinadas condições que possam afectar os resultados do teste. As condições que poderão dar origem a um resultado de Erro ("X") estão descritas na Secção 7 – Resolução de Problemas do Manual do Utilizador do Instrumento **BACTEC MGIT**.

Quando se reportam resultados, é importante incluir o método de teste, nome e concentração do fármaco, se o resultado é obtido com o sistema **BACTEC MGIT** ou com um método alternativo. O especialista em Doenças Infecciosas e/ou Pulmonares a cargo do controlo da TB deve ser consultado relativamente ao regime e posologias terapêuticas adequadas.

No caso de serem obtidos resultados de resistência inesperados, deverá confirmar-se a identificação do isolado testado como *M. tuberculosis*. Certifique-se de que foi apenas utilizada uma cultura pura (exclua a presença de micobactérias mistas, etc.). A mono-resistência a etambutol é rara e deve ser confirmada[2,8].

Relatório de resultados de concentração crítica no BACTEC MGIT 960 SIRE

Fármaco (concentração)	Resultado no Sistema MGIT	Relatório Recomendado	Acção
STR (1,0 µg/mL) INH (0,1 µg/mL) RIF (1,0 µg/mL) EMB (5,0 µg/mL)	Sensível (SIRE)	O isolado foi testado com o Sistema **BACTEC MGIT** [fármaco/concentração] e o resultado é sensível.	Nenhuma acção.
	Resistente (SIR)	O isolado foi testado com o Sistema **BACTEC MGIT** [fármaco/concentração] e o resultado é resistente. Seguem-se os resultados do teste do [fármaco] a uma concentração mais elevada (se tiver sido testada).	Recomenda-se o teste ocm uma concentração mais elevada (STR e/ou INH).
	Resistente (E)	<u>Se for resistente a mais do que etambutol (EMB)</u>, O isolado foi testado com o Sistema **BACTEC MGIT** [Etambutol 5,0 µg/mL] e o resultado é resistente. Consulte o laboratório para testar EMB com uma concentração mais elevada.	Recomenda-se o teste de EMB com uma concentração mais elevada utilizando um método alternativo.
		<u>Se for mono-resistente a etambutol (EMB)</u>, O isolado foi testado com o Sistema **BACTEC MGIT** [Etambutol 5,0 µg/mL] e o resultado é resistente. A mono-resistência a etambutol é rara. Consulte o laboratório para confirmação.	Recomend-se o teste de EMB com a concentração critica e concentração mais elevada com um método alternativo.
	Erro (X)	Nenhum relatório.	Repita o teste.

Relatório de resultados com o BACTEC MGIT 960 STR 4.0 e INH 0.4

Fármaco (concentração)	Resultado no Sistema MGIT	Relatório Recomendado	Acção
STR (4,0 µg/mL)	Sensível	O isolado foi testado com o Sistema **BACTEC MGIT** (estreptomicina 4,0 µg/mL) e o resultado é sensível. Este isolado, com um resultado de resistência a 1,0 µg/mL e um resultado sensível a 4,0 µg/mL, indica resistência de baixo nível a estreptomicina.	Nenhuma acção.
	Resistente	O isolado foi testado com o Sistema **BACTEC MGIT** (estreptomicina 4,0 µg/mL) e o resultado é resistente. Consulte o laboratório para confirmação.	O isolado deve ser testado com um método alternativo para confirmar o resultado.
	Erro (X)	Nenhum relatório.	Repita o teste.
INH (0,4 µg/mL)	Sensível	O isolado foi testado com o Sistema **BACTEC MGIT** (isoniazida 0,4 µg/mL) e o resultado é sensível. Este isolado, com um resultado de resistência a 0,1 µg/mL e um resultado sensível a 0,4 µg/mL, indica resistência de baixo nível a isoniazida.	Nenhuma acção.
	Resistente	O isolado foi testado com o Sistema **BACTEC MGIT** (isoniazida 0,4 µg/mL) e o resultado é resistente.	Nenhuma acção.
	Erro (X)	Nenhum relatório.	Repita o teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O teste de sensibilidade no sistema **BACTEC MGIT** não interpreta o grau de sensibilidade do isolado que está a ser testado. Os resultados são reportados como S, sensível ou R, resistente, para o fármaco e concentração testados.

O teste **BACTEC MGIT** 960 SIRE foi desenvolvido com concentrações críticas para estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol, que são ligeiramente inferiores às concentrações críticas utilizadas no MOP, para evitar uma falsa sensibilidade. O teste das concentrações mais elevadas, conforme recomendado, irá aumentar a capacidade para detectar isolados com resistência de baixo nível.

Os testes de sensibilidade no sistema **BACTEC MGIT** só podem ser efectuados utilizando um instrumento **BACTEC MGIT**. Os Conjuntos AST não podem ser lidos manualmente.

Utilizar exclusivamente culturas puras de *M. tuberculosis*. Culturas contaminadas ou contendo estirpes múltiplas de micobactérias podem dar origem a resultados errados e não devem ser testadas. Não se recomendam testes directos a partir de amostras clínicas.

Deverá permitir-se que suspensões feitas a partir de meios sólidos assentem durante os períodos de tempo prescritos antes da padronização. Preparações de inóculo feitas a partir de meios sólidos devem ser comparadas visualmente com um padrão de turvação de 0,5 de McFarland; se tal não for realizado, podem obter-se resultados imprecisos ou provocar-se um erro de Conjunto AST.

A não utilização de uma diluição de 1:5 da suspensão do microrganismo, quando indicado, para a inoculação dos tubos contendo o fármaco poderá fornecer resultados incorrectos.

A incapacidade de utilização de uma diluição a 1:100 da suspensão do microrganismo para inoculação do tubo de Controlo de Crescimento pode dar origem a resultados imprecisos ou a um erro do Conjunto AST.

A reconstituição dos fármacos com o volume incorrecto de água desionizada/destilada estéril poderá fornecer resultados imprecisos.

A homogeneização total dos tubos inoculados é importante. A não homogeneização adequada pode dar origem a resultados de falsa resistência.

A incapacidade de carregar os tubos do conjunto AST no Transportador do Conjunto AST na sequência adequado pode dar origem a resultados imprecisos. A incapacidade

de seleccionar a definição adequada do fármaco no transportador do conjunto pode dar origem a resultados inválidos ou imprecisos.

A incapacidade de carregar correctamente os tubos do conjunto AST no instrumento irá dar origem a uma situação anónima que tem que ser resolvida no prazo de oito horas. Se esta situação não for resolvida no prazo de oito horas, o Conjunto AST tem que ser eliminado e criado novamente.

A não utilização do SIRE Supplement no conjunto AST poderá fornecer resultados imprecisos. NÃO adicione Suplemento de Crescimento **BACTEC MGIT** ao conjunto AST.

VALORES ESPERADOS

Testou-se um total de 106 isolados clínicos de *M. tuberculosis* com o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE em quatro locais clínicos com localizações geogáficas diversas. Os testes incluíram isolados clínicos frescos e de stock, provenientes de culturas líquidas e sólidas. Foi efectuado um total de 200 testes de sensibilidade (líquidos e sólidos) com concentrações críticas de estreptomicina (STR), isoniazida (INH) e rifampicina (RIF) e foi realizado um total de 223 testes de sensibilidade (líquidos e sólidos) com a concentração crítica de etambutol (EMB) durante testes separados. O período médio de tempo global até à obtenção do resultado para o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE é de sete a oito dias, com um intervalo de quatro a quatorze dias. Os dados estão apresentados na Figura 1, no fim do folheto informativo.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

<u>Estudos Analíticos</u>

Intervalos de Inóculo AST em Meio Líquido e Sólido:

Meio líquido – O procedimento recomendado para a preparação de um Conjunto AST de um tubo **MGIT** de 7 mL positivo utiliza um inóculo directo no Dia 1 e Dia 2 pós-positividade e um inóculo diluído (1:5) no Dia 3 a Dia 5 pós-positividade. Estudos internos mostram que inóculos preparados a partir de um tubo **MGIT** de 7 mL positivo do Dia 1 a Dia 5 variam entre $0,8 \times 10^5$ e $3,2 \times 10^5$ UFC/mL.

Meio sólido - O procedimento recomendado para a preparação de um Conjunto AST a partir de crescimento em meio sólido (até 14 dias) utiliza uma diluição a 1:5 de suspensão de microrganismos equivalente a um padrão 0,5 de McFarland. Estudos internos mostram que inóculos preparados a partir de um meio de cultura sólido variam entre $1,4 \times 10^5$ e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL.

Reprodutibilidade de Lote:

A reprodutibilidade de lote foi avaliada utilizando 25 estirpes de *M. tuberculosis* (incluindo cinco estirpes ATCC). Cada teste **BACTEC MGIT** 960 SIRE, com a concentração crítica de fármaco, foi realizado em triplicado para um total de setenta e cinco resultados por fármaco. Cada réplica representou uma condição de teste separada, diferenciada por lote de fármaco SIRE e SIRE Supplement utilizado (três lotes cada).

Os isolados que foram determinados como resistentes a estreptomicina, isoniazida ou etambutol no teste inicial foram depois testados com a concentração de fármaco elevada, excepto as estirpes ATCC. Para além dos isolados resistentes testados, foram incluídos dois isolados sensíveis a STR (concentração crítica), dois isolados sensíveis a INH (concentração crítica) e dois isolados sensíveis a EMB (concentração crítica) no teste de perfil de sensibilidade. Os resultados observados foram comparados com os resultados esperados.

A reprodutibilidade global para cada fármaco com a concentração crítica é de 96% para STR, 100% para INH, 100% para RIF e 100% para EMB. A reprodutibilidade global para cada fármaco com a concentração elevada é de 96% para STR 4.0 e de 100% para INH 0.4.

Teste do Painel de Provocação do CDC:

O desempenho do teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE foi avaliado utilizando um painel de isolados de provocação, obtidos junto do Centro de Controlo e Prevenção das Doenças dos EUA (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) em GA, EUA. The painel foi constituído por 30 isolados de *M. tuberculosis* com padrões de sensibilidade conhecidos (utilizando MOP). O painel foi testado duas vezes com o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE e os dois resultados estiveram de acordo. Os resultados do teste **BACTEC MGIT** 960 SIRE foram comparados com os resultados esperados pelo CDC.

A concordância global com os resultados esperados pelo CDC para cada fármaco com a concentração crítica é de 93% para STR, 100% para INH, 100% para RIF e 100% para EMB. A concordância global com os resultados esperados pelo CDC para cada fármaco com a concentração elevada é de 96% para STR 4.0 e de 100% para INH 0.4.

Avaliação Clínica

O teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE foi avaliado em quatro locais clínicos com localizações geográficas diversas, constituídos por centros regionais de referência e laboratórios baseados em hospitais universitários, incluindo um local estrangeiro. O teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE foi comparado com o método de teste de sensibilidade Método de Proporção (MOP)[2]. A avaliação inicial incluiu os fármacos estreptomicina, isoniazida e rifampicina. Foi efectuada uma avaliação separada para o fármaco etambutol.

Teste de Reprodutibilidade:

A reprodutibilidade do teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE foi avaliada nos locais clínicos utilizando um painel de dez isolados qualificados, incluindo vários isolados resistentes a cada um dos fármacos. Os resultados do teste **BACTEC MGIT** 960 SIRE foram comparados com os resultados esperados. A reprodutibilidade global para cada fármaco com a concentração crítica é de 98,9% para STR, 99,7% para INH, 99,2% para RIF e 97,5% para EMB. Os resultados de reprodutibilidade dos locais individuais oscilaram entre 89,9% e 100% para os resultados combinados da concentração crítica do fármaco. A reprodutibilidade global para cada fármaco com a concentração elevada é de 99,7% para STR 4.0 e de 95,6% para INH 0.4. Os resultados de reprodutibilidade dos locais individuais oscilaram entre 92,2% e 100% para os resultados combinados da concentração elevada do fármaco.

Teste do Painel de Provocação do CDC:

O desempenho do teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE foi avaliado utilizando um painel de isolados de provocação, obtidos junto do Centro de Controlo e Prevenção das Doenças dos EUA (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) em GA, EUA. The painel foi constituído por 30 isolados de *M. tuberculosis* com padrões de sensibilidade conhecidos (utilizando MOP).

No Quadro 1 apresenta-se a concordância entre os teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE comparativamente com os resultados esperados do CDC, para cada fármaco.

Quadro 1: Painel de Provocação do CDC – Teste nos Locais Clínicos com o BACTEC MGIT 960

MGIT 960	Número testado	Número de correctos	% de Correctos
STR 1.0	120	111	92,5
INH 0.1	120	119	99,2
RIF 1.0	120	120	100
EMB 5.0	119	111	93,3
STR 4.0	29*	29	100
INH 0.4	87*	82	94,3

*Os isolados resistentes com concentrações críticas foram os únicos testados com STR 4.0 e INH 0.4.

Teste de Isolados Clínicos:

Testou-se um total de 106 isolados clínicos de *M. tuberculosis* com o teste de sensibilidade **BACTEC MGIT** 960 SIRE e com o teste de sensibilidade MOP. Os testes incluíram isolados clínicos frescos e de stock, provenientes de culturas líquidas e sólidas. Tal produziu um total de 195 resultados de teste para o teste de sensibilidade inicial efectuado para estreptomicina, isoniazida e rifampicina (concentração crítica). Foi efectuada uma avaliação separada de etambutol a partir de alíquotas congeladas dos isolados clínicos e de stock originais, bem como de isolados clínicos prospectivos provenientes de fontes de cultura líquidas e sólidas. Tal produziu um total de 223 resultados de teste para o teste de etambutol com a concentração crítica.

No Quadro 2 apresentam-se os resultados do teste de isolados clínicos para cada fármaco (concentração crítica) a partir de culturas de de origem líquidas. No Quadro 3 apresentam-se os resultados do teste de isolados clínicos para cada fármaco (concentração crítica) a partir de culturas de de origem sólidas.

Quadro 2: Resultados dos Isolados Clínicos - BACTEC MGIT 960 AST Comparado com o Método de Proporção a Partir de Culturas de Origem Líquidas

Método de Proporção				Sistema MGIT 960 AST				
FÁRMACO	**Concen-tração**	**S**	**R**	**Concen-tração**	**Resultados de Sensível # Concordantes**	**% Concordância (95 % CI)**	**Resultado de Resistente # Concordantes**	**% Concordância (95 % CI)**
STR	2,0 µg/mL	69	27	1,0 µg/mL	62	90 (80–96)	26	96 (81–100)
INH	0,2 µg/mL	59	37	0,1 µg/mL	57	97 (88–100)	36	97 (86–100)
RIF	1,0 µg/mL	72	24	1,0 µg/mL	71	99 (93–100)	24	100 (95–100)
EMB	5,0 µg/mL	91	20	5,0 µg/mL	88	97 (91–99)	17	85 (62–97)

Todos os isolados com resultados **MGIT** discordantes foram testados com MOP em dois locais independentes. Do sete isolados resistentes a STR discordantes (R-960, S-MOP), três apresentaram resultados de resistente nos dois locais e um apresentou resultados de sensível nos dois locais. Os restantes três apresentaram resultados de resistente num local e resultados de sensível no outro local. O isolado sensível a STR discordante (S-960, R-MOP) apresentou resultados de sensível nos dois locais. O dois isolados resistentes a INH discordantes (R-960, S-MOP) apresentaram resultados de sensível nos dois locais. O isolado sensível a INH (S-960, R-MOP) discordante apresentou resultados de sensível nos dois locais. O isolado resistente a RIF (R-960, S-MOP) discordante apresentou resultados de resistente nos dois locais. O três isolados resistentes a EMB discordantes (R-960, S-MOP) apresentaram resultados de sensível nos dois locais. Dos três isolados sensíveis a EMB discordantes (S-960, R-MOP), dois apresentaram resultados de sensível nos dois locais e um apresentou resultado de resistente num local e resultado de sensível no outro local.

Quadro 3: Resultados dos Isolados Clínicos - BACTEC MGIT 960 AST Comparado com o Método de Proporção a Partir de Culturas de Origem Sólidas

Método de Proporção				Sistema MGIT 960 AST				
FÁRMACO	**Concen-tração**	**S**	**R**	**Concen-tração**	**Resultados de Sensível # Concordantes**	**% Concordância (95 % CI)**	**Resultado de Resistente # Concordantes**	**% Concordância (95 % CI)**
STR	2,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	65	93 (84–98)	28	97 (82–100)
INH	0,2 µg/mL	63	36	0,1 µg/mL	62	98 (92–100)	35	97 (86–100)
RIF	1,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	70	100 (95–100)	26	90 (73–98)
EMB	5,0 µg/mL	87	25	5,0 µg/mL	86	99 (94–100)	20	80 (59–93)

Todos os isolados com resultados **MGIT** discordantes foram testados com MOP em dois locais independentes. Dos cinco isolados resistentes a STR discordantes (R-960, S-MOP), dois apresentaram resultados de resistente nos dois locais e um apresentou resultados de sensível nos dois locais. Os restantes dois apresentaram resultados de resistente num local e resultados de sensível no outro local. O isolado sensível a STR discordante (S-960, R-MOP) apresentou resultados de resistente nos dois locais. O isolado resistente a INH (R-960, S-MOP) discordante apresentou resultados de sensível nos dois locais. O isolado sensível a INH discordante (S-960, R-MOP) apresentou resultados de resistente nos dois locais. Os três isolados sensíveis a RIF (S-960, R-MOP) discordantes apresentaram resultados de sensível nos dois locais. O isolado resistente a EMB (R-960, S-MOP) discordante apresentou resultados de resistente nos dois locais. Dos cinco isolados sensíveis a EMB (S-960, R-MOP) discordantes, quatro apresentaram resultados de sensível nos dois locais. O restante isolado apresentou um resultado de resistente num local e um resultado de sensível no outro local.

No Quadro 4 apresentam-se os resultados dos testes com isolados clínicos para estreptomicina e isoniazida (concentração elevada) de culturas de origem líquidas. No Quadro 5 apresentam-se os resultados dos testes com isolados clínicos para estreptomicina e isoniazida (concentração elevada) de culturas de origem sólidas.

Quadro 4: Resultados dos Isolados Clínicos - BACTEC MGIT 960 AST Comparado com o Método de Proporção a Partir de Culturas de Origem Líquidas.

Método de Proporção				Sistema MGIT 960 AST				
FÁRMACO	**Concentração**	**S**	**R**	**Concentração**	**Resultados de Sensível # Concordantes**	**% Concordância (95 % CI)**	**Resultado de Resistente # Concordantes**	**% Concordância (95 % CI)**
STR	10,0 µg/mL	77	19	4,0 µg/mL	73*	95 (87–99)	17	90 (67–99)
INH	1,0 µg/mL	65	31	0,4 µg/mL	65*	100 (95–100)	29	94 (79–99)

* Assume um resultado de S para concentração elevada do fármaco **MGIT** para todos os isolados com resultado de S para concentração baixa do fármaco **MGIT**.

Todos os isolados com resultados **MGIT** discordantes foram testados com MOP em dois locais independentes. Os quatro isolados resistentes a STR discordantes (R-960, S-MOP) apresentaram resultados de sensível nos dois locais. Dos dois isolados sensíveis a STR discordantes (S-960, R-MOP), um apresentou resultados de sensível nos dois locais e um apresentou resultados de resistente nos dois locais. Dos dois isolados sensíveis a INH discordantes (S-960, R-MOP), um apresentou resultados de sensível nos dois locais e um apresentou resultados de resistente nos dois locais.

Quadro 5: Resultados dos Isolados Clínicos - BACTEC MGIT 960 AST Comparado com o Método de Proporção a Partir de Culturas de Origem Sólidas

Método de Proporção				Sistema MGIT 960 AST				
FÁRMACO	**Concentração**	**S**	**R**	**Concentração**	**Resultados de Sensível # Concordantes**	**% Concordância (95 % CI)**	**Resultado de Resistente # Concordantes**	**% Concordância (95 % CI)**
STR	10,0 µg/mL	78	21	4,0 µg/mL	73*	94 (86–98)	17	81 (58–95)
INH	1,0 µg/mL	68	31	0,4 µg/mL	68*	100 (95–100)	30	97 (83–100)

* Assume um resultado de S para concentração elevada do fármaco **MGIT** para todos os isolados com resultado de S para concentração baixa do fármaco **MGIT**.

Todos os isolados com resultados **MGIT** discordantes foram testados com MOP em dois locais independentes. Os cinco isolados resistentes a STR discordantes (R-960, S-MOP) apresentaram resultados de sensível nos dois locais. Dos quatro isolados sensíveis a STR discordantes (S-960, R-MOP), três apresentaram resultados de sensível nos dois locais e um apresentou resultados de resistente nos dois locais. O isolado sensível a INH discordante (S-960, R-MOP) apresentou resultados de resistente nos dois locais.

APRESENTAÇÃO

N.° de Cat.	Descrição
245123	**BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit, caixa de 4 frascos de fármaco liofilizado e 8 SIRE Supplements.
245125	**BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 Kit, caixa de 1 frasco de fármaco liofilizado e 2 SIRE Supplements.
245157	**BACTEC MGIT** 960 IR Kit, caixa de 2 frascos de fármaco liofilizado e 4 SIRE Supplements.
245126	**BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 Kit, caixa de 1 frasco de fármaco liofilizado e 2 SIRE Supplements.

BIBLIOGRAFIA : Consulte "References" no texto em Inglês.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

Importado e Distribuído no Brasil por:
Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda
Rua Cyro Correia Pereira 550, Curitiba – Paraná-Brasil
CNPJ 21.551.379/0013-31
Serviço de Suporte Tecnico (11) 5185-9961
Registro ANVISA nº 10033430440
Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555 654

BD Kit BACTEC MGIT 960 SIRE
Para el análisis de sensibilidad antimicobacteriana de *Mycobacterium tuberculosis*

Español

USO PREVISTO

El kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE es un procedimiento cualitativo rápido para el análisis de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*, obtenida en cultivo, a estreptomicina (STR), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) y etambutol (EMB). Los kits **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 y **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 están diseñados para el análisis a concentraciones más altas del antibiótico.

Los kits para análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 se utilizan con los sistemas **BACTEC MGIT** 960 y **BACTEC MGIT** 320.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El análisis de sensibilidad antimicobacteriana es útil para el tratamiento adecuado de pacientes con tuberculosis. Por lo general, el tratamiento antituberculoso consiste en una polifarmacoterapia que incluye los antibióticos antimicobacterianos estreptomicina, isoniazida, rifampicina y etambutol. Es importante que los antibióticos antimicobacterianos recetados presenten la actividad apropiada frente a *Mycobacterium tuberculosis*, es decir, que la cepa aislada sea sensible al antibiótico.

Recientemente, la aparición de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (TB-MR) se ha convertido en un serio problema para la salud pública[1]. La resistencia a cualquiera de los cuatro antibióticos principales, estreptomicina (STR), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) y etambutol (EMB), hace más difícil y caro el tratamiento de la enfermedad. La rápida detección de estas cepas aisladas resistentes es esencial para proporcionar un tratamiento eficaz al paciente.

Para el análisis de la sensibilidad antimicobacteriana se han utilizado generalmente dos métodos. El primer método, conocido como método de las proporciones[2], utiliza el agar Middlebrook y Cohn 7H10. Este método compara el número de colonias en medios con y sin antibiótico. Se detecta resistencia a un antibiótico cuando al menos el 1 % de una población bacteriana es resistente a la concentración del antibiótico analizado. Generalmente, los resultados pueden obtenerse después de 21 días de incubación. El segundo método, conocido como método radiométrico de sensibilidad **BACTEC** 460TB[3], tarda generalmente de 4 a 12 días. Este método se basa en la producción de dióxido de carbono marcado radioactivamente con ^{14}C por parte de las micobacterias en crecimiento; esta producción se manifiesta por un aumento del índice de crecimiento en el sistema.

Tradicionalmente, el procedimiento del método de las proporciones (MP) ha incluido el análisis de la sensibilidad de *M. tuberculosis* con dos concentraciones de los agentes antimicrobianos. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS) sigue recomendando que el procedimiento del análisis MP incluya dos concentraciones de los principales antibióticos analizados, con la excepción de rifampicina. Las concentraciones bajas recomendadas para el procedimiento MP representan las concentraciones críticas para estos antibióticos. Se define concentración crítica como la concentración del antibiótico que permite interpretar un resultado como resistencia o sensibilidad. Se determina que una cepa aislada es resistente si al menos el 1 % de la población analizada crece en presencia de la concentración crítica del antibiótico. La concentración alta del antibiótico se utiliza para obtener un perfil del grado de resistencia en la población analizada. Este resultado proporciona al médico información que le ayuda a determinar si es necesario modificar el tratamiento.

El análisis **BACTEC MGIT** 960 SIRE proporciona el resultado de la sensibilidad en aproximadamente el mismo margen de tiempo que el sistema **BACTEC** 460TB. Además, este método no es radiométrico y permite, en la mayoría de los casos, que los resultados de la sensibilidad se informen antes que con el procedimiento MP.

El análisis **BACTEC MGIT** 960 SIRE se desarrolló con concentraciones críticas de estreptomicina, isoniazida, rifampicina y etambutol ligeramente inferiores a las concentraciones críticas utilizadas en el procedimiento MP con el fin de evitar resultados falsos de sensibilidad. Esto es más evidente con estreptomicina, para la que muchas cepas aisladas se encuentran próximas a la concentración crítica recomendada conforme al procedimiento MP. Por este motivo, se desarrolló una segunda concentración más alta para estreptomicina e isoniazida. Se puede informar un resultado de sensibilidad a la concentración crítica sin necesidad de realizar más análisis. Las cepas aisladas resistentes a la concentración crítica de estreptomicina, isoniazida y/o etambutol deben analizarse a una concentración más alta del antibiótico con el sistema **BACTEC MGIT** o con un método alternativo. En este caso, puede informarse un resultado final de resistencia a la concentración crítica, con un aviso de que se están realizando análisis adicionales a una concentración más alta.

Es importante analizar a una concentración más alta las cepas aisladas resistentes con el fin de identificar las cepas que presentan una resistencia de bajo grado, es decir, resistencia a la concentración crítica y sensibilidad a la concentración alta. Las concentraciones altas previstas en el sistema **BACTEC MGIT** eran inferiores a las concentraciones utilizadas en el procedimiento MP. Con este diseño del sistema **BACTEC MGIT**, un resultado de resistencia, especialmente para estreptomicina, puede no asociarse siempre a un resultado de resistencia a la concentración alta en el procedimiento MP. Si se obtiene un resultado para estreptomicina de resistencia a la concentración alta, debe realizarse un análisis a esta concentración con un método alternativo.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El tubo indicador de crecimiento micobacteriano **BBL MGIT** de 7 mL es un tubo que contiene caldo Middlebrook 7H9 modificado que permite el crecimiento y la detección de micobacterias (véase el prospecto del tubo **BBL MGIT** de 7 mL). El tubo **MGIT** contiene un compuesto fluorescente incluido en silicona que se encuentra en la parte inferior de un tubo de 16 x 100 mm de fondo redondo. El compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. La concentración inicial de oxígeno disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto, por lo que se detecta poca fluorescencia. Más tarde, los microorganismos, al respirar y crecer activamente, consumen el oxígeno, lo cual permite la fluorescencia del compuesto.

El kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE es un análisis cualitativo con una duración de 4 a 13 días. El análisis se basa en la comparación del crecimiento de la cepa aislada de *M. tuberculosis* en un tubo que contiene antibiótico con el crecimiento en un tubo sin antibiótico (control de crecimiento). El instrumento **BACTEC MGIT** controla los tubos para detectar un aumento de su fluorescencia. El instrumento utiliza el análisis de la fluorescencia del tubo con antibiótico en comparación con la fluorescencia del tubo de control de crecimiento para determinar los resultados de sensibilidad.

El instrumento **BACTEC MGIT** interpreta automáticamente estos resultados e informa un resultado de sensibilidad o resistencia.

REACTIVO

El kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE contiene frascos individuales de estreptomicina, isoniazida, rifampicina y etambutol liofilizados y ocho frascos de suplemento SIRE.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: estreptomicina ..... 332 µg
Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: isoniazida .... 33,2 µg
Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: rifampicina .... 332 µg
Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: etambutol .... 1660 µg

El kit **BACTEC MGIT** 960 IR contiene un frasco de isoniazida y un de rifampicina liofilizados y cuatro frascos de suplemento SIRE.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Isoniazida .... 33,2 µg
Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Rifampicina .... 332 µg

El kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 contiene un frasco de estreptomicina liofilizada y dos frascos de suplemento SIRE.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: estreptomicina ..... 664 µg

El kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 contiene un frasco de isoniazida liofilizada y dos frascos de suplemento SIRE.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: isoniazida .... 66,4 µg

El suplemento **BACTEC MGIT** 960 SIRE contiene 20 mL de medio de enriquecimiento Middlebrook OADC.

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada:

Albúmina bovina ....50,0 g   Catalasa.....................0,03 g
Dextrosa ....20,0 g   Ácido oleico ....0,6 g

**Ajustada y/o enriquecida para satisfacer los criterios de rendimiento.*

Almacenamiento y reconstitución de los reactivos: Frascos de antibiótico **BACTEC MGIT** 960 SIRE: tras su entrega, almacenar los frascos de antibiótico liofilizado a 2 – 8 °C. Una vez reconstituidas, las soluciones de antibiótico pueden ser congeladas y almacenadas a una temperatura igual o inferior a -20 °C durante un máximo de seis meses, siempre que este período no sobrepase la fecha de caducidad original. Una vez descongeladas, las soluciones deben utilizarse inmediatamente. Desechar cualquier porción no utilizada.

Suplemento **BACTEC MGIT** SIRE: tras su entrega, almacenar en un lugar oscuro a 2 – 8 °C. Evitar la congelación y el sobrecalentamiento. Abrir y usar antes de la fecha de caducidad. Reducir al mínimo la exposición a la luz.

Instrucciones de uso:

Reconstituir cada frasco de estreptomicina liofilizada del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con **4 mL** de agua estéril destilada/desionizada para preparar una solución de reserva de 83 µg/mL.

Reconstituir cada frasco de isoniazida liofilizada del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con **4 mL** de agua estéril destilada/desionizada para preparar una solución de reserva de 8,3 µg/mL.

Reconstituir cada frasco de rifampicina liofilizada del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con **4 mL** de agua estéril destilada/desionizada para preparar una solución de reserva de 83 µg/mL.

Reconstituir cada frasco de etambutol liofilizado del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con **4 mL** de agua estéril destilada/desionizada para preparar una solución de reserva de 415 µg/mL.

NOTA: Los antibióticos siguientes se reconstituyen con un volumen diferente. Si no se utiliza el volumen apropiado de agua destilada estéril para la reconstitución de las concentraciones altas de antibiótico, se invalidarán los resultados de los análisis.

Reconstituir cada frasco de estreptomicina liofilizada del kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 con **2 mL** de agua estéril destilada/desionizada para preparar una solución de reserva de 332 µg/mL.

Reconstituir cada frasco de isoniazida liofilizada del kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 con **2 mL** de agua estéril destilada/desionizada para preparar una solución de reserva de 33,2 µg/mL.

Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro.*

MUESTRA DE ANÁLISIS POTENCIALMENTE INFECCIOSA: En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar"[4-7] y las directrices del centro.

El trabajo con cultivos de *M. tuberculosis* requiere prácticas, equipo de contención e instalaciones de nivel de seguridad biológica (BSL)3.

El usuario debe leer y seguir las instrucciones contenidas en todos los prospectos correspondientes, incluido el tubo indicador de crecimiento micobacteriano **BBL MGIT** de 7 mL.

Antes de usarlos, el usuario debe revisar los tubos y frascos en busca de indicios de contaminación o daño. Deben desecharse los tubos o frascos que no parezcan aptos. Deben examinarse detenidamente los tubos que se hayan caído. Los tubos que presenten daños deben desecharse.

En caso de que se rompa un tubo: 1) cerrar los cajones del instrumento; 2) apagar el instrumento; 3) desalojar la zona inmediatamente; 4) consultar las normas de su centro o de los CDC. Un tubo inoculado que tiene pérdidas o está roto puede producir un aerosol de micobacterias; deben observarse las normas de manipulación adecuadas.

Todos los tubos **MGIT** inoculados deben ser esterilizados en autoclave antes de su eliminación.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Todas las preparaciones detalladas a continuación deben realizarse a partir de cultivos puros de *M. tuberculosis*. El laboratorio debe confirmar, mediante técnicas de identificación apropiadas, que la cepa aislada que se va a analizar es un cultivo puro de *M. tuberculosis*.

El inóculo puede prepararse a partir de un medio sólido de un tubo **BACTEC MGIT** 7 mL positivo. Además, los cultivos que crecen en medios líquidos y sólidos se pueden utilizar para preparar un tubo **MGIT** de siembra que sirve para preparar el inóculo. Cada una de estas opciones se describen a continuación.

Preparación del inóculo aislado a partir de medios sólidos:

NOTA: Es importante preparar el inóculo conforme a las instrucciones presentadas a continuación para obtener la concentración apropiada del microorganismo para el análisis de sensibilidad.

1. Agregar 4 mL de caldo **BBL** Middlebrook 7H9 (o caldo **BBL MGIT**) a un tubo estéril de 16,5 x 128 mm con tapón que contiene 8 – 10 microesferas de vidrio.
2. Con un asa esterilizada, separar el mayor número posible de colonias de un cultivo de 14 días como máximo, procurando evitar recoger medio sólido. Poner en suspensión las colonias en el caldo Middlebrook 7H9.
3. Agitar la suspensión en un agitador Vortex durante 2 – 3 min para dispersar los grumos más grandes. La turbidez de la suspensión debe superar el patrón 1,0 de McFarland.
4. Dejar que la suspensión repose durante 20 min sin moverla.

5. Transferir el líquido sobrenadante a otro tubo estéril de 16,5 x 128 mm con tapón (evitar transferir parte del sedimento) y dejar reposar durante otros 15 min.
6. Transferir el líquido sobrenadante (éste debe estar homogéneo, sin grumos) a un tercer tubo estéril de 16,5 x 128 mm. NOTA: En este paso, la suspensión del microorganismo debe ser superior al patrón 0,5 de McFarland.
7. Ajustar la suspensión a un patrón 0.5 de McFarland mediante comparación visual con el patrón de turbidez 0,5 de McFarland. No ajustar por debajo de un patrón 0,5 de McFarland.
8. Diluir 1 mL de la suspensión ajustada en 4 mL de solución salina estéril (dilución de 1:5). Continuar con el "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad".

Preparación del inóculo a partir de un tubo BACTEC MGIT de 7 mL positivo:

NOTA: Es importante preparar el inóculo utilizando las referencias de tiempo presentadas a continuación para obtener la concentración apropiada del microorganismo para el análisis de sensibilidad.

1. El primer día en que el instrumento registra un resultado positivo para un tubo **MGIT** se considera el día 0.
2. Para la preparación del inóculo de análisis, debe usarse un tubo **MGIT** de 7 mL positivo el día **después** de que el instrumento **BACTEC MGIT** registre el resultado positivo (día 1) hasta el quinto día inclusive (día 5) después de que el instrumento registre el resultado positivo. Si un tubo ha permanecido positivo más de cinco días, se debe hacer un subcultivo en un nuevo tubo **MGIT** de 7 mL que contenga suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT**, analizarlo en el instrumento **BACTEC MGIT** hasta que muestre positividad y utilizarlo de uno a cinco días después de mostrar positividad. Consulte "Preparación de un tubo **MGIT** de siembra a partir de medios líquidos."
3. Si el tubo es positivo los días 1 ó 2, utilice el caldo de suspensión **MGIT** para los procedimientos de inoculación. Mezclar bien. Continuar con el "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad".
4. Si el tubo es positivo los días 3, 4 ó 5, mezclar bien y diluir 1 mL del caldo positivo en 4 mL de solución salina estéril (dilución de 1:5). Mezcle bien el tubo. Utilizar la suspensión diluida para los procedimientos de inoculación. Continuar con el "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad".

Preparación de un tubo MGIT de siembra a partir de medios líquidos

1. Mezcle el tubo por inversión o agitación vorticial.
2. Haga una dilución 1:100 añadiendo 0,1 mL del cultivo a 10 mL de caldo **BBL** Middlebrook 7H9 o caldo **BBL MGIT**. Mezclar bien.
3. Añada 0,5 mL de esta suspensión a 7 mL de tubo **MGIT** al que se han añadido 0,8 mL de suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT**.
4. Cierre bien y mezcle suavemente invirtiendo 2 a 3 veces.
5. Ponga el tubo en el instrumento **BACTEC MGIT** y analice hasta obtener un resultado positivo.

   NOTA: El tiempo necesario hasta lograr la positividad **debe** de ser igual o superior a 4 días para su uso como inóculo AST. Si el tubo se vuelve positivo antes de que transcurran 4 días, vuelva al paso 1 y prepare un nuevo tubo de siembra.
6. Proceda a utilizar este tubo durante uno a cinco días después de la positividad. Continúe con el apartado anterior "Preparación del inóculo a partir de un tubo **BACTEC MGIT** de 7 mL positivo".

Preparación de un tubo MGIT de siembra a partir de medios sólidos

1. Con un asa de inoculación estéril retire el crecimiento del agar inclinado y añádalo a un tubo **MGIT** de 7 mL suplementado con 0,8 mL de suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT**.
2. Cierre bien y mezcle suavemente invirtiendo 2 a 3 veces.
3. Ponga el tubo en el instrumento **BACTEC MGIT** y analice hasta obtener un resultado positivo.

   NOTA: El tiempo necesario hasta lograr la positividad **debe** de ser igual o superior a 4 días para su uso como inóculo AST. Si el tubo se vuelve positivo antes de que transcurran 4 días, vuelva al paso 1 y prepare un nuevo tubo de siembra.
4. Proceda a utilizar este tubo durante uno a cinco días después de la positividad. Continúe con el apartado anterior "Preparación del inóculo a partir de un tubo **BACTEC MGIT** de 7 mL positivo".

PROCEDIMIENTO

Material suministrado: kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE con un frasco de cada antibiótico liofilizado y ocho frascos de suplemento SIRE (se obtienen aproximadamente 40 análisis con cada antibiótico del kit), kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0 con un frasco de cada antibiótico liofilizado y dos frascos de suplemento SIRE (aproximadamente 20 análisis por kit), y kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4 con un frasco de cada antibiótico liofilizado y dos frascos de suplemento SIRE (aproximadamente 20 análisis por kit).

Materiales necesarios pero no suministrados: tubos indicadores de crecimiento micobacteriano **BBL MGIT** de 7 mL, medios de cultivo auxiliares, reactivos, microorganismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio necesario para este procedimiento.

Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad con el kit BACTEC MGIT 960 SIRE:

1. Etiquetar cinco tubos **MGIT** de 7 mL para cada cepa aislada analizada. Etiquetar uno como GC (control de crecimiento), uno como STR, uno como INH, uno como RIF y uno como EMB. Colocar los tubos en la secuencia correcta en el transportador del tamaño apropiado para el conjunto de AST (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**).
2. Agregar asépticamente 0,8 mL de suplemento **BACTEC MGIT** SIRE a cada tubo. NOTA: Es importante usar el suplemento suministrado con el kit.
3. Con una micropipeta, transferir asépticamente 100 µL de la solución **MGIT** STR de 83 µg/mL al tubo **MGIT** que tiene la etiqueta correspondiente. Con una pipeta, transferir asépticamente 100 µL de la solución **MGIT** INH de 8,3 µg/mL al tubo **MGIT** que tiene la etiqueta correspondiente. Con una pipeta, transferir asépticamente 100 µL de la solución **MGIT** RIF de 83 µg/mL al tubo **MGIT** que tiene la etiqueta correspondiente. Con una pipeta, transferir asépticamente 100 µL de la solución **MGIT** EMB de 415 µg/mL al tubo **MGIT** que tiene la etiqueta correspondiente. Es importante agregar el antibiótico apropiado al tubo correspondiente. No deben agregarse antibióticos al tubo **MGIT** GC.

Antibiótico	Concentración del antibiótico reconstituido*	Volumen añadido a los tubos MGIT para el análisis	Concentración final en los tubos MGIT
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1 µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0 µg/mL

* Estos antibióticos deben reconstituirse utilizando **4 mL** de agua estéril/desionizada para lograr las concentraciones indicadas.

4. **Preparación e inoculación del tubo de control de crecimiento:** con una pipeta, transferir asépticamente 0,1 mL de la suspensión de microorganismos (véase "**PREPARACIÓN DEL INÓCULO**") a 10 mL de solución salina estéril para preparar la suspensión 1:100 de control de crecimiento. Mezclar bien la suspensión de control de crecimiento. Inocular **0,5** mL de la suspensión 1:100 de control de crecimiento en el tubo **MGIT** que tiene la etiqueta "GC".
5. **Inoculación de los tubos que contienen antibióticos:** con una pipeta, transferir asépticamente 0,5 mL de la suspensión de microorganismos (véase "**PREPARACIÓN DEL INÓCULO**") a cada uno de los CUATRO tubos de antibiótico restantes (STR, INH, RIF, EMB).
6. Volver a cerrar bien los tubos. Mezclar bien los tubos invirtiéndolos suavemente entre tres y cuatro veces.
7. Introducir el conjunto de AST en el instrumento **BACTEC MGIT** utilizando la función de introducción del conjunto de AST (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**). Al utilizar la función de introducción del conjunto de AST, es preciso asegurarse de que el orden de los tubos en el transportador del conjunto de AST coincide con las definiciones seleccionadas para el transportador.
8. Extender 0,1 mL de la suspensión de microorganismos en una placa de agar soja **Trypticase** con 5 % de sangre de carnero (TSA II). Colocar la placa dentro de una bolsa de plástico. Incubar a 35 – 37 °C.
9. Inspeccionar la placa de agar sangre a las 48 h en busca de contaminación bacteriana. Si la placa de agar sangre no muestra crecimiento, continuar el análisis AST. Si la placa de agar sangre muestra crecimiento, desechar el conjunto de AST (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**) y repetir el análisis con un cultivo puro.

Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad con los kits BACTEC MGIT 960 STR 4.0 e INH 0.4:

Si se produce resistencia a la concentración crítica, se recomienda realizar un análisis del perfil de sensibilidad que, al menos, analice la concentración alta del antibiótico a la que la cepa aislada mostró resistencia originalmente.

Fuente de la cepa aislada: la cepa aislada utilizada para este análisis debe haberse preparado conforme a las instrucciones descritas en "**PREPARACIÓN DEL INÓCULO**". Se puede preparar un tubo de siembra a partir del tubo de control de crecimiento del conjunto de AST previamente analizado de la cepa aislada mediante la inoculación de 0,5 mL en un nuevo tubo **MGIT** de 7 mL que contenga el suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT** 960. Una vez que el tubo de siembra sea registrado como positivo por el instrumento, proceder conforme a las instrucciones descritas en "**PREPARACIÓN DEL INÓCULO:** Preparación a partir de un tubo **MGIT** positivo".

1. Etiquetar suficientes tubos **MGIT** de 7 mL para que la cepa aislada analizada tenga un tubo **MGIT** GC (control de crecimiento) y un tubo **MGIT** de antibiótico para cada antimicrobiano analizado. Colocar los tubos en la secuencia correcta en el transportador del tamaño apropiado para el conjunto de AST (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**).
2. Agregar asépticamente 0,8 mL de suplemento **BACTEC MGIT** SIRE a cada tubo. NOTA: Es importante usar el suplemento suministrado con el kit.
3. Con una micropipeta, transferir asépticamente 100 µL de la solución de antibiótico al tubo **MGIT** que tiene la etiqueta correspondiente. Es importante agregar el antibiótico apropiado al tubo correspondiente. No deben agregarse antibióticos al tubo **MGIT** GC.

Antibiótico	Concentración del antibiótico reconstituido*	Volumen añadido a los tubos MGIT para el análisis	Concentración final en los tubos MGIT
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4,0 µg/mL
MGIT INH 0.4	33,2 µg/mL	100 µL	0,4 µg/mL

* Estos antibióticos deben reconstituirse utilizando **2 mL** de agua estéril/desionizada para lograr las concentraciones indicadas.

4. **Preparación e inoculación del tubo de control de crecimiento:** con una pipeta, transferir asépticamente 0,1 mL de la suspensión de microorganismos (véase "**PREPARACIÓN DEL INÓCULO**") a 10 mL de solución salina estéril para preparar la suspensión 1:100 de control de crecimiento. Mezclar bien la suspensión de control de crecimiento. Inocular **0,5** mL de la suspensión 1:100 de control de crecimiento en el tubo **MGIT** que tiene la etiqueta "GC".
5. **Inoculación de los tubos que contienen antibióticos:** con una pipeta, transferir asépticamente 0,5 mL de la suspensión de microorganismos (véase "**PREPARACIÓN DEL INÓCULO**") a cada uno de los tubos de antibiótico.
6. Volver a cerrar bien los tubos. Mezclar bien los tubos invirtiéndolos suavemente entre tres y cuatro veces.
7. Introducir el conjunto de AST en el instrumento **BACTEC MGIT** utilizando la función de introducción del conjunto de AST (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**). Al utilizar la función de introducción del conjunto de AST, es preciso asegurarse de que el orden de los tubos en el transportador del conjunto de AST coincide con las definiciones seleccionadas para el transportador.
8. Extender 0,1 mL de la suspensión de microorganismos en una placa de agar soja **Trypticase** con 5 % de sangre de carnero (TSA II). Colocar la placa dentro de una bolsa de plástico. Incubar a 35 – 37 °C.
9. Inspeccionar la placa de agar sangre a las 48 h en busca de contaminación bacteriana. Si la placa de agar sangre no muestra crecimiento, continuar el análisis AST. Si la placa de agar sangre muestra crecimiento, desechar el conjunto de AST (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**) y repetir el análisis con un cultivo puro.

NOTA: El análisis de sensibilidad puede configurarse en diversos formatos. Por ejemplo, se puede configurar el sistema para un transportador de cinco tubos que contiene únicamente las concentraciones críticas. Se pueden configurar otros transportadores de tubos dependiendo de los análisis de perfil optativos que se estén realizando (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**).

Control de calidad del usuario: después de la entrega de un nuevo envío o número de lote de frascos del kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE, se recomienda analizar el microorganismo de control indicado a continuación. El microorganismo de control debe ser un cultivo

puro, el cual debe prepararse conforme a las instrucciones descritas en "**PREPARACIÓN DEL INÓCULO**".

El conjunto de AST de control de calidad (QC) debe prepararse conforme a las instrucciones descritas en "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad" para los kits de antibióticos analizados. Algunas consideraciones importantes al preparar el conjunto de AST de QC son la correcta reconstitución de los antibióticos liofilizados y la correcta dilución del microorganismo de QC para los tubos de control de crecimiento y de antibiótico.

Es importante agregar el antibiótico apropiado al tubo con la etiqueta correspondiente. El uso del microorganismo de QC pansensible no detectará un antibiótico incorrecto pipeteado en tubos del conjunto de AST.

La constatación de los resultados apropiados, mostrados a continuación, en el plazo de 4 – 13 días indica que el kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE está listo para el análisis de cepas aisladas de pacientes. Si no se observan los resultados apropiados, repetir la prueba. Si los resultados obtenidos al repetir la prueba siguen siendo inapropiados, no utilizar el producto hasta contactar con el representante local de Becton Dickinson.

Cepas	**GC**	**MGIT STR**	**MGIT INH**	**MGIT RIF**	**MGIT EMB**
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Cepas	**GC**	**MGIT STR 4.0**	**MGIT INH 0.4**
M. tuberculosis ATCC 27294	Positivo	Sensible	Sensible

Cuando se realizan análisis de sensibilidad, debe analizarse el mismo microorganismo de control como control de calidad de lote una vez a la semana. Si el QC de lote no supera el análisis, no deben informarse los resultados del paciente para los antibióticos que no hayan superado este período de análisis. Repetir el QC para los antibióticos y cepas aisladas del paciente afectados por el fallo inicial del QC. Si el QC repetido no produce los resultados esperados, no deben informarse los resultados del paciente. No utilizar el producto hasta contactar con el representante local de Becton Dickinson.

Durante la evaluación externa de los kits **BACTEC MGIT** 960 SIRE, las causas más frecuentes de fallo del QC fueron la contaminación de los cultivos de QC, una inoculación excesiva o insuficiente de los conjuntos de AST, la adición de antibióticos a los tubos incorrectos y errores del instrumento.

RESULTADOS

El instrumento **BACTEC MGIT** controlará los conjuntos de AST hasta que se obtenga una determinación de resistencia o sensibilidad. Una vez completado el análisis del conjunto, los resultados son informados por el instrumento **BACTEC MGIT** (véase el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**). El instrumento **BACTEC MGIT** informará el resultado de un conjunto de AST como Error(X), sin interpretación de la sensibilidad, en ciertas situaciones que podrían influir en los resultados del análisis. Las situaciones que podrían dar lugar a un resultado de Error(X) se describen en el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**, sección 7 – Resolución de problemas.

Al informar los resultados, es importante incluir el método de análisis, el nombre y la concentración del antibiótico, y si el resultado se ha obtenido con el sistema **BACTEC MGIT** o con un método alternativo. Debe consultarse al especialista de Neumología o Enfermedades Infecciosas especializado en el control de la tuberculosis con respecto al tratamiento y la posología apropiados.

En caso de obtener resultados de resistencia inesperados, comprobar la identificación de la cepa aislada analizada como *M. tuberculosis*. Es preciso asegurarse de que se ha utilizado exclusivamente un cultivo puro (hay que descartar la presencia de mezclas de micobacterias, etc.). La monorresistencia a etambutol es muy poco frecuente, por lo que debe comprobarse[2,8].

Informe de resultados a la concentración crítica con BACTEC MGIT 960 SIRE

Antibiótico (concentración)	Resultado del sistema MGIT	Informe recomendado	Acción
STR (1,0 µg/mL) INH (0,1 µg/mL) RIF (1,0 µg/mL) EMB (5,0 µg/mL)	Sensible (SIRE)	Cepa aislada con el sistema **BACTEC MGIT** [antibiótico/concentración] con resultado de sensibilidad.	No se requiere ninguna acción.
	Resistente (SIR)	Cepa aislada con el sistema **BACTEC MGIT** [antibiótico/concentración] con resultado de resistencia. Debe seguirse de los resultados del análisis de [antibiótico] a una concentración más alta (si se realiza).	Se recomienda realizar un análisis a una concentración más alta (STR y/o INH).
	Resistente (E)	<u>En caso de resistencia a otros antibióticos además de a etambutol (EMB)</u> Cepa aislada analizada con el sistema **BACTEC MGIT** [etambutol 5,0 µg/mL] con resultado de resistencia. Consultar al laboratorio para realizar un análisis con EMB a una concentración más alta.	Se recomienda realizar un análisis con EMB a una concentración más alta utilizando un método alternativo.
		<u>En caso de monorresistencia a etambutol (EMB)</u> Cepa aislada con el sistema **BACTEC MGIT** [etambutol 5,0 µg/mL] con resultado de resistencia. La monorresistencia a etambutol es muy poco frecuente. Consultar al laboratorio para obtener confirmación.	Se recomienda realizar un análisis con EMB a la concentración crítica y a una concentración más alta con un método alternativo.
	Error (X)	No generar informe.	Repetir el análisis.

Informe de resultados con BACTEC MGIT 960 STR 4.0 e INH 0.4

Antibiótico (concentración)	Resultado del sistema MGIT	Informe recomendado	Acción
STR (4,0 µg/mL)	Sensible	Cepa aislada analizada con el sistema **BACTEC MGIT** (estreptomicina 4,0 µg/mL) con resultado de sensibilidad. Esta cepa aislada, con un resultado de resistencia a 1,0 µg/mL y un resultado de sensibilidad a 4,0 µg/mL, indica una resistencia de bajo grado a estreptomicina.	No se requiere ninguna acción.
	Resistente	Cepa aislada analizada con el sistema **BACTEC MGIT** (estreptomicina 4,0 µg/mL) con resultado de resistencia. Consultar al laboratorio para obtener confirmación.	La cepa aislada debe analizarse con un método alternativo para confirmar el resultado.
	Error (X)	No generar informe.	Repetir el análisis.
INH (0,4 µg/mL)	Sensible	Cepa aislada analizada con el sistema **BACTEC MGIT** (isoniazida 0,4 µg/mL) con resultado de sensibilidad. Esta cepa aislada, con un resultado de resistencia a 0,1 µg/mL y un resultado de sensibilidad a 0,4 µg/ml, indica una resistencia de bajo grado a isoniazida.	No se requiere ninguna acción.
	Resistente	Cepa aislada analizada con el sistema **BACTEC MGIT** (isoniazida 0,4 µg/mL) con resultado de resistencia.	No se requiere ninguna acción.
	Error (X)	No generar informe.	Repetir el análisis.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El análisis de sensibilidad con el sistema **BACTEC MGIT** no interpreta la sensibilidad de la cepa aislada analizada. Los resultados se informan como S (sensible) o R (resistente) para el antibiótico y la concentración analizados.

El análisis **BACTEC MGIT** 960 SIRE se desarrolló con concentraciones críticas de estreptomicina, isoniazida, rifampicina y etambutol ligeramente inferiores a las concentraciones críticas utilizadas en el procedimiento MP con el fin de evitar resultados falsos de sensibilidad. El análisis de las concentraciones más altas conforme a las recomendaciones mejorará la capacidad de detectar cepas aisladas con una resistencia de bajo grado.

Los análisis de sensibilidad con el sistema **BACTEC MGIT** sólo pueden realizarse con un instrumento **BACTEC MGIT**. Los conjuntos de AST no pueden leerse manualmente.

Sólo deben utilizarse cultivos puros de *M. tuberculosis*. No deben analizarse cultivos que estén contaminados o que contengan varias cepas de micobacterias, ya que pueden producir resultados erróneos. No se recomienda el análisis directo de muestras clínicas.

Se debe permitir que las suspensiones preparadas a partir de medios sólidos reposen durante el tiempo prescrito antes de realizar la estandarización. Las preparaciones de inóculos a partir de medios sólidos deben compararse visualmente con un patrón de turbidez 0.5 de McFarland; en caso contrario, pueden obtenerse resultados inexactos o puede producirse un error del conjunto de AST.

Si no se utiliza la dilución de 1:5 de la suspensión de microorganismos, en los casos en que esté indicado, para inocular los tubos que contienen el antibiótico, pueden obtenerse resultados inexactos.

Si no se utiliza una dilución de 1:100 de la suspensión de microorganismos para inocular el tubo de control de crecimiento, pueden obtenerse resultados inexactos o puede producirse un error del conjunto de AST.

Si no se reconstituyen los antibióticos con los volúmenes apropiados de agua estéril destilada/desionizada, pueden obtenerse resultados inexactos.

Es importante mezclar bien los tubos inoculados. En caso contrario, pueden obtenerse resultados falsos de resistencia.

Si no se colocan los tubos del conjunto de AST en el transportador en el orden correcto, pueden obtenerse resultados inexactos. Si no se selecciona la definición de antibióticos del transportador del conjunto de AST apropiada, pueden obtenerse resultados no válidos o inexactos.

Si no se carga correctamente el conjunto de AST en el instrumento, se originará una situación de identificación anónima que debe resolverse en el plazo de ocho horas. Si la situación no se resuelve en ese período de tiempo, se debe desechar el conjunto de AST y comenzar de nuevo.

Si no se utiliza el suplemento SIRE en el conjunto de AST, pueden obtenerse resultados inexactos. NO agregue suplemento de crecimiento **BACTEC MGIT** al conjunto de AST.

VALORES PREVISTOS

Se analizó un total de 106 cepas clínicas de *M. tuberculosis* con el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE en cuatro centros de diferente localización geográfica. El análisis incluyó cepas aisladas de reserva y cepas clínicas recién aisladas a partir de cultivos líquidos y sólidos. Se realizó un total de 200 análisis de sensibilidad (cultivos líquidos y sólidos) a las concentraciones críticas de estreptomicina (STR), isoniazida (INH) y rifampicina (RIF) y un total de 223 análisis de sensibilidad (cultivos líquidos y sólidos) a la concentración crítica de etambutol (EMB) durante análisis diferentes. El tiempo medio global transcurrido hasta la obtención del resultado para el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE es de siete a ocho días, con un intervalo de cuatro a catorce días. Los datos se muestran en la Figura 1 al final del prospecto.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

<u>Estudios analíticos</u>

Intervalos de inóculos de AST de medios líquidos y sólidos:

Medios líquidos: el procedimiento recomendado para preparar un conjunto de AST a partir de un tubo **MGIT** de 7 mL positivo utiliza un inóculo directo los días 1 y 2 después del registro de positividad y un inóculo diluido (1:5) los días 3 a 5 después del registro de positividad. Los estudios internos muestran que los inóculos preparados a partir de un tubo **MGIT** de 7 mL positivo de los días 1 a 5 varía entre 0,8 x 10^5 y 3,2 x 10^5 UFC/mL.

Medios sólidos: el procedimiento recomendado para preparar un conjunto de AST a partir del crecimiento en medios sólidos (hasta 14 días) utiliza una dilución de 1:5 de

una suspensión de microorganismos equivalente a un patrón 0.5 de McFarland. Los estudios internos muestran que los inóculos preparados a partir de cultivos en medios sólidos varían entre 1,4 x 10^5 y 2,4 x 10^6 UFC/mL.

Reproducibilidad en lote:

La reproducibilidad en lote se evaluó utilizando 25 cepas aisladas de *M. tuberculosis* (incluidas cinco cepas de ATCC). Cada análisis **BACTEC MGIT** 960 SIRE a la concentración crítica del antibiótico se realizó por triplicado para un total de 75 resultados por antibiótico. Cada duplicado representaba una situación de análisis diferente diferenciada por lote de antibiótico SIRE y por suplemento SIRE utilizado (tres lotes cada uno).

Las cepas aisladas que tuvieron un resultado de resistencia a estreptomicina, isoniazida o etambutol en el análisis inicial se analizaron de nuevo a la concentración alta del antibiótico, salvo las cepas ATCC. Además de las cepas aisladas resistentes analizadas, en el análisis del perfil de sensibilidad se incluyeron dos cepas aisladas sensibles a STR (concentración crítica), dos cepas aisladas sensibles a INH (concentración crítica) y dos cepas aisladas sensibles a EMB (concentración crítica). Se compararon los resultados observados con los resultados previstos.

La reproducibilidad global para cada antibiótico a la concentración crítica es del 96 % para STR, el 100 % para INH, el 100 % para RIF y el 100 % para EMB. La reproducibilidad global para cada antibiótico a la concentración alta es del 96 % para STR 4.0 y del 100 % para INH 0.4.

Análisis del panel de referencia de los CDC:

El rendimiento del análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE se evaluó por medio de un panel de cepas aisladas de referencia obtenido de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Georgia, EE.UU. El panel estaba constituido por treinta cepas aisladas de *M. tuberculosis* con patrones de sensibilidad conocidos (por medio del procedimiento MP). Se analizó el panel dos veces con el sistema de análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE, y ambos resultados coincidieron. Se compararon los resultados del análisis **BACTEC MGIT** 960 SIRE con los resultados previstos conforme a los CDC.

La concordancia global con los resultados previstos conforme a los CDC para cada antibiótico a la concentración crítica es del 93 % para STR, el 100 % para INH, el 100 % para RIF y el 100 % para EMB. La concordancia global con los resultados previstos conforme a los CDC para cada antibiótico a la concentración alta es del 100 % para STR 4.0 y del 100 % para INH 0.4.

<u>Evaluación clínica</u>

El análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE se evaluó en cuatro centros clínicos de distinta localización geográfica, compuestos por centros regionales de referencia y laboratorios de hospitales universitarios, incluido un centro de fuera de Estados Unidos. Se comparó el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE con el método de proporciones (MP)[2] para análisis de la sensibilidad. La evaluación inicial incluyó los antibióticos estreptomicina, isoniazida y rifampicina. Se realizó una evaluación independiente para el antibiótico etambutol.

Análisis de la reproducibilidad:

La reproducibilidad del análisis **BACTEC MGIT** 960 SIRE se evaluó en los centros clínicos utilizando un panel de diez cepas aisladas cualificadas, incluidas varias cepas resistentes a cada uno de los antibióticos. Se compararon los resultados del análisis **BACTEC MGIT** 960 SIRE con los resultados previstos. La reproducibilidad global para cada antibiótico a la concentración crítica es del 98,9 % para STR, el 99,7 % para INH, el 99,2 % para RIF y el 97,5 % para EMB. La reproducibilidad individual en cada centro varió entre el 89,9 % y el 100 % para los resultados combinados de los antibióticos a la concentración crítica. La reproducibilidad global para cada antibiótico a la concentración alta es del 99,7 % para STR 4.0 y del 95,6 % para INH 0.4. La reproducibilidad individual en cada centro varió entre el 92,2 % y el 100 % para los resultados combinados de los antibióticos a la concentración alta.

Análisis del panel de referencia de los CDC:

El rendimiento del análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE se evaluó por medio de un panel de cepas aisladas de referencia obtenido de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Georgia, EE.UU. El panel estaba constituido por treinta cepas aisladas de *M. tuberculosis* con patrones de sensibilidad conocidos (por medio del procedimiento MP) analizadas en cada centro clínico.

La Tabla 1 muestra la concordancia del análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE para cada antibiótico en comparación con los resultados previstos conforme a los CDC.

Tabla 1. Panel de referencia de los CDC: análisis BACTEC MGIT 960 en centros clínicos

MGIT 960	Número de cepas analizadas	Número correcto	% de corrección
STR 1.0	120	111	92,5
INH 0.1	120	119	99,2
RIF 1.0	120	120	100
EMB 5.0	119	111	93,3
STR 4.0	29*	29	100
INH 0.4	87*	82	94,3

* Sólo cepas aisladas resistentes a las concentraciones críticas analizadas con STR 4.0 e INH 0.4.

Análisis de cepas clínicas:

Se analizó un total de 106 cepas clínicas de *M. tuberculosis* con el análisis de sensibilidad **BACTEC MGIT** 960 SIRE y el análisis de sensibilidad MP. El análisis incluyó cepas aisladas de reserva y cepas clínicas recién aisladas a partir de cultivos líquidos y sólidos. Se obtuvo un total de 195 resultados para el análisis inicial de la sensibilidad realizado para estreptomicina, isoniazida y rifampicina (concentración crítica). Se realizó una evaluación independiente de etambutol a partir de partes alícuotas congeladas de cepas aisladas de reserva y cepas clínicas originales, así como a partir de cepas clínicas prospectivas procedentes de cultivos líquidos y sólidos. Se obtuvo un total de 223 resultados para el análisis de etambutol a la concentración crítica.

La Tabla 2 presenta los resultados del análisis de cepas clínicas para cada antibiótico (concentración crítica) a partir de cultivos líquidos. La Tabla 3 presenta los resultados del análisis de cepas clínicas para cada antibiótico (concentración crítica) a partir de cultivos sólidos.

Tabla 2. Resultados de cepas clínicas: análisis BACTEC MGIT 960 AST en comparación con el método de proporciones a partir de cultivos líquidos

	Método de proporciones			Sistema MGIT 960 AST				
					Resultados de sensibilidad		Resultados de resistencia	
Antibiótico	Concentración	S	R	Concentración	N.º de concordancias	% de concordancia (95% CI)	N.º de concordancias	% de concordancia (95% CI)
STR	2,0 µg/mL	69	27	1,0 µg/mL	62	90 (80–96)	26	96 (81–100)
INH	0,2 µg/mL	59	37	0,1 µg/mL	57	97 (88–100)	36	97 (86–100)
RIF	1,0 µg/mL	72	24	1,0 µg/mL	71	99 (93–100)	24	100 (95–100)
EMB	5,0 µg/mL	91	20	5,0 µg/mL	88	97 (91–99)	17	85 (62–97)

Todas las cepas aisladas con resultados discordantes en el **MGIT** se analizaron por medio del procedimiento MP en dos centros independientes. De las siete cepas aisladas resistentes a STR con resultados discordantes (R-960, S-MP), tres tuvieron resultados de resistencia en ambos centros y una tuvo resultados de sensibilidad en ambos centros. Las otras tres cepas aisladas tuvieron resultados de resistencia en un centro y resultados de sensibilidad en el otro. La cepa aislada sensible a STR con resultados discordantes (S-960, R-MP) tuvo resultados de sensibilidad en ambos centros. Las dos cepas aisladas resistentes a INH con resultados discordantes (R-960, S-MP) tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros. La cepa aislada sensible a INH con resultados discordantes (S-960, R-MP) tuvo resultados de sensibilidad en ambos centros. La cepa aislada resistente a RIF con resultados discordantes (R-960, S-MP) tuvo resultados de resistencia en ambos centros. Las tres cepas resistentes a EMB con resultados discordantes (R-960, S-MP) tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros. De las tres cepas aisladas sensibles a EMB con resultados discordantes (S-960, R-MP), dos tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros y una tuvo un resultado de resistencia en un centro y un resultado de sensibilidad en el otro.

Tabla 3. Resultados de cepas clínicas: análisis BACTEC MGIT 960 AST en comparación con el método de proporciones a partir de cultivos sólidos

	Método de proporciones			Sistema MGIT 960 AST				
Anti biótico	Concen- tración	S	R	Concen- tración	Resultados de sensibilidad N.º de concordancias	% de concordancia (95% CI)	Resultados de resistencia N.º de concordancias	% de concordancia (95% CI)
STR	2,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	65	93 (84–98)	28	97 (82–100)
INH	0,2 µg/mL	63	36	0,1 µg/mL	62	98 (92–100)	35	97 (86–100)
RIF	1,0 µg/mL	70	29	1,0 µg/mL	70	100 (95–100)	26	90 (73–98)
EMB	5,0 µg/mL	87	25	5,0 µg/mL	86	99 (94–100)	20	80 (59–93)

Todas las cepas aisladas con resultados discordantes en el **MGIT** se analizaron por medio del procedimiento MP en dos centros independientes. De las cinco cepas aisladas resistentes a STR con resultados discordantes (R-960, S-MP), dos tuvieron resultados de resistencia en ambos centros y una tuvo resultados de sensibilidad en ambos centros. Las otras dos cepas tuvieron resultados de resistencia en un centro y resultados de sensibilidad en el otro. La cepa aislada sensible a STR con resultados discordantes (S-960, R-MP) tuvo resultados de resistencia en ambos centros. La cepa aislada resistente a INH con resultados discordantes (R-960, S-MP) tuvo resultados de sensibilidad en ambos centros. La cepa aislada sensible a INH con resultados discordantes (S-960, R-MP) tuvo resultados de resistencia en ambos centros. Las tres cepas aisladas sensibles a RIF con resultados discordantes (S-960, R-MP) tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros. La cepa aislada resistente a EMB con resultados discordantes (R-960, S-MP) tuvo resultados de resistencia en ambos centros. De las cinco cepas aisladas sensibles a EMB con resultados discordantes (S-960, R-MP), cuatro tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros. La otra cepa aislada tuvo un resultado de resistencia en un centro y un resultado de sensibilidad en el otro.

La Tabla 4 presenta los resultados del análisis de cepas clínicas para estreptomicina e isoniazida (concentración alta) a partir de cultivos líquidos. La Tabla 5 presenta los resultados del análisis de cepas clínicas para estreptomicina e isoniazida (concentración alta) a partir de cultivos sólidos.

Tabla 4. Resultados de cepas clínicas: análisis BACTEC MGIT 960 AST en comparación con el método de proporciones a partir de cultivos líquidos

	Método de proporciones			Sistema MGIT 960 AST				
Anti biótico	Concen- tración	S	R	Concen- tración	Resultados de sensibilidad N.º de concordancias	% de concordancia (95% CI)	Resultados de resistencia N.º de concordancias	% de concordancia (95% CI)
STR	10,0 µg/mL	77	19	4,0 µg/mL	73*	95 (87–99)	17	90 (67–99)
INH	1,0 µg/mL	65	31	0,4 µg/mL	65*	100 (95–100)	29	94 (79–99)

* Se supone un resultado S para el antibiótico a la concentración alta con el **MGIT** para todas las cepas aisladas con un resultado S para el antibiótico a la concentración baja con el **MGIT**.

Todas las cepas aisladas con resultados discordantes en el **MGIT** se analizaron por medio del procedimiento MP en dos centros independientes. Las cuatro cepas resistentes a STR con resultados discordantes (R-960, S-MP) tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros. De las dos cepas sensibles a STR con resultados discordantes (S-960, R-MP), una tuvo resultados de sensibilidad en ambos centros y la otra tuvo resultados de resistencia en ambos centros. De las dos cepas aisladas sensibles a INH con resultados discordantes (S-960, R-MP), una tuvo resultados de sensibilidad en ambos centros y la otra tuvo resultados de resistencia en ambos centros.

Tabla 5. Resultados de cepas clínicas: análisis BACTEC MGIT 960 AST en comparación con el método de proporciones a partir de cultivos sólidos

	Método de proporciones			Sistema MGIT 960 AST				
Antibiótico	**Concentración**	**S**	**R**	**Concentración**	**Resultados de sensibilidad N.º de concordancias**	**% de concordancia (95% CI)**	**Resultados de resistencia N.º de concordancias**	**% de concordancia (95% CI)**
STR	10,0 µg/mL	78	21	4.0 µg/mL	73*	94 (86–98)	17	81 (58–95)
INH	1,0 µg/mL	68	31	0.4 µg/mL	68*	100 (95–100)	30	97 (83–100)

* Se supone un resultado S para el antibiótico a la concentración alta con el **MGIT** para todas las cepas aisladas con un resultado S para el antibiótico con la concentración baja con el **MGIT**.

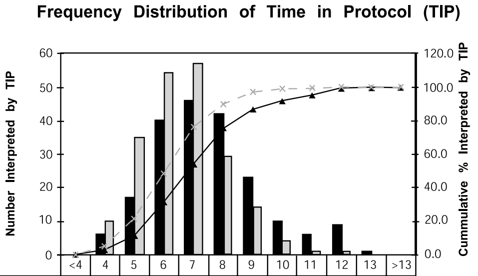
Todas las cepas aisladas con resultados discordantes en el **MGIT** se analizaron por medio del procedimiento MP en dos centros independientes. Las cinco cepas resistentes a STR con resultados discordantes (R-960, S-MP) tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros. De las cuatro cepas sensibles a STR con resultados discordantes (S-960, R-MP), tres tuvieron resultados de sensibilidad en ambos centros y una tuvo resultados de resistencia en ambos centros. La cepa aislada sensible a INH con resultados discordantes (S-960, R-MP) tuvo resultados de resistencia en ambos centros.

DISPONIBILIDAD

Nº cat.	Descripción
245123	Kit **BACTEC MGIT** 960 SIRE, caja de 4 frascos de antibióticos liofilizados y 8 frascos de Suplemento SIRE.
245125	Kit **BACTEC MGIT** 960 STR 4.0, caja de 1 frasco de antibiótico liofilizado y 2 frascos de Suplemento SIRE.
245157	Kit **BACTEC MGIT** 960 IR, caja de 2 frasco de antibiótico liofilizado y 4 frascos de Suplemento SIRE.
245126	Kit **BACTEC MGIT** 960 INH 0.4, caja de 1 frasco de antibiótico liofilizado y 2 frascos de Suplemento SIRE.

REFERENCIAS: Véase la sección “References” en el texto inglés.

Figure 1: Distribution of **BACTEC MGIT** 960 AST Time in Protocol / Figure 1 : Distribution du temps dans le protocole **BACTEC MGIT** 960 AST / Abbildung 1: Verteilung der **BACTEC MGIT** 960 AST-Testzeiten / Figura 1 - Distribuzione della durata del protocollo **BACTEC MGIT** 960 AST / Figura 1: Distribuição do período de tempo do **BACTEC MGIT** 960 AST no Protocolo / Figura 1. Distribución del tiempo de análisis con el sistema **BACTEC MGIT** 960 AST



	<4	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	>13
Number of SIR AST Sets Interpreted by TIP	0	6	17	40	46	42	23	10	6	9	1	0
Number of EMB AST Sets Interpreted by TIP	0	10	35	54	57	29	14	4	1	1	0	0
Cumulative SIR % Interpreted	0.0	3.0	11.5	31.5	54.5	75.5	87.0	92.0	95.0	99.5	100.0	100.0
Cumulative EMB % Interpreted	0.0	4.9	22.0	48.3	76.1	90.2	97.1	99.0	99.5	100.0	100.0	100.0

Number of SIR AST Sets Interpreted by TIP — Number of EMB AST Sets Interpreted by TIP — Cumulative SIR % Interpreted — Cumulative EMB % Interpreted

Frequency Distribution of Time in Protocol (TIP) / Distribution de fréquence du temps dans le protocole (TDP) / Häufigkeitsverteilung der Testzeiten (TZ) / Frequenza di distribuzione della durata del protocollo (TIP) / Distribuição da frequência do Tempo de Permanência no Protocolo (TIP) / Distribución de frecuencias del tiempo de análisis (TA)

Number Interpreted by TIP / Nombre interprété par TDP / Anzahl der Auswertungen nach TZ / Numero interpretato mediante TIP / Número interpretado por TIP / Número interpretado por TA

Cumulative % Interpreted by TIP / % cumulatif interprété par TDP / Kumulative Prozentzahl der Auswertungen nach TZ / % cumulativa interpretata mediante TIP / Percentagem cumulativa interpretada por TIP / Porcentaje acumulado interpretado por TA

Number of SIR AST Sets Interpreted by TIP / Nombre de modules AST SIR interprétés par TDP / Anzahl ausgewerteter SIR-AST-Ansätze nach TZ / Numero di set AST SIR interpretati mediante TIP / Número de conjuntos AST de SIR interpretados por TIP / Número de conjuntos de AST SIR interpretados por TA

Number of EMB AST Sets Interpreted by TIP / Nombre de modules AST EMB interprétés par TDP / Anzahl ausgewerteter EMB-AST-Ansätze nach TZ / Numero di set AST EMB interpretati mediante TIP / Número de conjuntos AST de EMB interpretados por TIP / Número de conjuntos de AST EMB interpretados por TA

Cumulative SIR % Interpreted / % SIR cumulatifs interprétés / Kumulative Prozentzahl ausgewerteter SIR / % cumulativa di SIR interpretata / Percentagem cumulativa de SIR interpretada / Porcentaje acumulado de SIR interpretado

Cumulative EMB % Interpreted / % EMB cumulatifs interprétés / Kumulative Prozentzahl ausgewerteter EMB / % cumulativa di EMB interpretata / Percentagem cumulativa de EMB interpretada / Porcentaje acumulado de EMB interpretado

Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производител / Producător / Üretici / Proizvođač / Производитель / Атқарушы

Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före / Използвайте до / A se utiliza până la / Son kullanma tarihi / Upotrebiti do / Использовать до / дейін пайдалануға / Upotrijebiti do /
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce)
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutning af måned) /
JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä)
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mėnesio pabaiga)
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutten av måneden)
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiaca)
aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutet på månaden) /
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /
ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы) /
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)

REF Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Número de catálogo / Каталожен номер / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloški broj / Номер по каталогу / Каталог нөмірі

EC REP Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselet az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизиран представител в EU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u EU

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaite / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisas / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diyagnostik Tıbbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Жасанды жағдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku

Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegränsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura

LOT

Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargenummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (лот) / Топтама коды / Lot (kod)

Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οσηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds

EC REP Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland